

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES  
ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Desarrollo y somitogénesis de *Engystomops guayaco* (Anura: Leptodactylidae) desde el  
huevo fecundado hasta la eclosión del renacuajo.

Disertación previa a la obtención del título de Licenciado en Ciencias Biológicas

CHRISTIAN BERNABÉ ANDRADE CAHUEÑAS

Quito, 2015

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Certifico que la disertación de Licenciatura en Ciencias Biológicas del candidato Christian Bernabé Andrade Cahueñas ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.

Dr. Oscar D. Pérez

Director de la Disertación

Quito, 27 de Abril del 2015

*A mis padres*

## AGRADECIMIENTOS

A mis padres por el apoyo incondicional durante todo el proceso. Por permitirme tropezar y caer pero enseñarme a levantarme. A ti Bryam por ser un ejemplo de lucha y superación y sobre todo a ti Steff por sacarme una sonrisa cuando más lo necesito.

Agradezco especialmente a la Doctora Eugenia del Pino por su apoyo y guía profesional, por sus consejos y confianza brindada durante este trabajo.

Quiero agradecer a los miembros del Laboratorio de Biología del Desarrollo, en especial a Alexandra y María José por la inmensa ayuda y colaboración a lo largo de este trabajo. Además, a Jennifer y Anita Belén por su ayuda y sobre todo por la paciencia que me tuvieron durante esta etapa.

A la Pontificia Universidad Católica del Ecuador por la beca de investigación otorgada a la Dra. Eugenia del Pino. Al Centro de Investigación y Conservación de Anfibios (CICA), el cual se encarga del manejo de las instalaciones de la iniciativa de conservación “Balsa de los sapos” por la donación de los embriones utilizados en este estudio.

A mis amigos quienes hicieron de mi vida universitaria una verdadera aventura. A Nicolás y Diego quienes me enseñaron a no dejar de soñar y me han brindado su amistad sincera siempre, apoyándome durante los buenos y malos momentos de mi vida.

## TABLA DE CONTENIDOS

1. RESUMEN .....	14
2. ABSTRACT .....	15
3. INTRODUCCIÓN .....	16
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
4.1 OBTENCIÓN Y CULTIVO DE LOS EMBRIONES .....	26
4.2 PROCESAMIENTO Y FIJACIÓN DE LOS EMBRIONES .....	26
4.2.1 SOLUCIONES Y FIJATIVOS .....	26
4.2.1.1. SOLUCIÓN DE STEINBERG (Rugh, 1965) .....	26
4.2.1.2. SOLUCIÓN SALINA TAMPÓN FOSFATO (PBS).....	27
4.2.1.3. FORMALINA 10 % .....	27
4.2.1.4. FIJATIVO SMITH (Smith, 1912).....	27
4.2.1.4.1. SOLUCIÓN A .....	27
4.2.1.4.2. SOLUCIÓN B.....	27
4.2.1.5. FIJATIVO DE MEMFA.....	28
4.2.1.6. GELATINA 7,5%.....	28
4.2.1.7. AGAROSA 6% .....	28
4.2.2 PROCESAMIENTO DE LOS EMBRIONES .....	28
4.2.3 FIJACIÓN DE EMBRIONES.....	29
4.2.3.1 FIJACIÓN CON SMITH .....	29
4.2.3.2. FIJACIÓN CON MEMFA .....	29
4.3 OBSERVACIÓN DE LA MORFOLOGÍA Y ESTRUCTURA INTERNA DE LOS EMBRIONES.....	30
4.3.1 BISECCIONES .....	30
4.3.2 SECCIONES EN VIBRATOMO .....	30
4.3.3. TINCIÓN FLUORESCENTE PARA NÚCLEOS CON HOECHST 33258	31

4.4. INMUNODETECCIÓN EN MONTAJE ENTERO.....	31
4.4.1. SOLUCIONES, TAMPONES Y ANTICUERPOS .....	31
4.4.1.2. TBS-Tr.....	32
4.4.1.3. TBTM .....	32
4.4.1.4. TAMPÓN DIG .....	32
4.4.1.5. TAMPÓN 4 .....	32
4.4.1.6. SOLUCIÓN NBT .....	33
4.4.1.7. SOLUCIÓN BCIP .....	33
4.4.1.8. REACTIVO DE COLOR .....	33
4.4.1.9. BB/BA .....	33
4.4.1.10. SSC .....	33
4.4.1.11. ANTICUERPOS.....	33
4.4.1.11.1. ANTICUERPO PRIMARIO.....	33
4.4.1.11.2. ANTICUERPO SECUNDARIO .....	34
4.4.2. PROCEDIMIENTO PARA LA INMUNODETECCIÓN .....	34
4.4.2.1. RECUPERACIÓN DEL ANTÍGENO .....	34
4.4.2.2. BLOQUEO DE LA UNIÓN NO ESPECÍFICA .....	34
4.4.2.3. INCUBACIÓN DEL ANTICUERPO PRIMARIO .....	35
4.4.2.4. LAVADO DEL ANTICUERPO PRIMARIO.....	35
4.4.2.5. INCUBACIÓN DEL ANTICUERPO SECUNDARIO .....	36
4.4.2.6. LAVADO DEL ANTICUERPO SECUNDARIO .....	36
4.4.2.7. REACCIÓN DE COLOR.....	36
4.5. PROCESAMIENTO DE EMBRIONES INMUNOTEÑIDOS .....	37
4.5.1. DESPIGMENTACIÓN DE EMBRIONES .....	37
4.6. FOTOGRAFÍA DE EMBRIONES ENTEROS, BISECCIONES, SECCIONES, PLACAS Y EMBRIONES INMUNOTEÑIDOS.....	37
5. RESULTADOS .....	39
5.1. EL DESARROLLO TEMPRANO DE <i>E. guayaco</i> .....	39
5.2. MORFOLOGÍA EXTERNA E INTERNA DE LOS EMBRIONES DE <i>E.</i> <i>guayaco</i> .....	40

5.2.1. MORFOLOGIA DEL HUEVO Y CLIVAJE (ESTADIO 1-3) DE <i>E. guayaco</i> . .....	40
5.2.2. MORFOLOGIA Y ESTRUCTURA INTERNA DEL EMBRIÓN EN ESTADIO DE 32 CÉLULAS (ESTADIO 6) DE <i>E. guayaco</i> . .....	41
5.2.3. MORFOLOGIA DE LA BLÁSTULA DE CÉLULAS GRANDES (ESTADIO 7) DE <i>E. guayaco</i> . .....	41
5.2.4. MORFOLOGIA DE LA BLÁSTULA DE CÉLULAS MEDIANAS (ESTADIO 8) DE <i>E. guayaco</i> . .....	42
5.2.5. MORFOLOGIA Y ESTRUCTURA INTERNA DE LA GÁSTRULA TEMPRANA. ESTADIO: LABIO DORSAL DEL BLASTOPORO (ESTADIO 10) DE <i>E. guayaco</i> . .....	42
5.2.6. MORFOLOGIA Y ESTRUCTURA INTERNA DE LA GÁSTRULA MEDIA. ESTADIO: TAPÓN DE YEMA GRANDE (ESTADIO 11) DE <i>E. guayaco</i> . .....	43
5.2.7. MORFOLOGIA Y ESTRUCTURA INTERNA DE LA GÁSTRULA TARDÍA. ESTADIO: TAPÓN DE YEMA MEDIANO (ESTADIO 12) DE <i>E. guayaco</i> . .....	44
5.2.8. MORFOLOGIA Y ESTRUCTURA INTERNA DE LA GÁSTRULA TARDÍA (ESTADIO 12.5) DE <i>E. guayaco</i> . .....	44
5.2.9. MORFOLOGIA Y ESTRUCTURA INTERNA DE LA POST-GÁSTRULA (ESTADIO 13) DE <i>E. guayaco</i> . .....	45
5.2.10. MORFOLOGÍA Y ESTRUCTURA INTERNA DE LA NÉURULA TEMPRANA (ESTADIO 14) DE <i>E. guayaco</i> . .....	46
5.2.11. MORFOLOGÍA Y ESTRUCTURA INTERNA DE LA NÉURULA MEDIA (ESTADIO 15) DE <i>E. guayaco</i> . .....	46
5.2.12. MORFOLOGÍA Y ESTRUCTURA INTERNA DE LA NÉURULA TARDÍA (ESTADIO 16) DE <i>E. guayaco</i> . .....	47
5.2.13. MORFOLOGÍA Y ESTRUCTURA INTERNA DEL ESTADIO DE YEMA DE LA COLA (ESTADIO 17) DE <i>E. guayaco</i> .....	47
5.2.14. MORFOLOGÍA DEL ESTADIO DE RESPUESTA MUSCULAR (ESTADIO 18) DE <i>E. guayaco</i> . .....	48
5.2.15. MORFOLOGÍA DEL ESTADIO DE YEMA DE LAS BRANQUIAS (ESTADIO 19) DE <i>E. guayaco</i> . .....	49
5.2.16. MORFOLOGÍA DEL ESTADIO DE DESARROLLO COMPLETO DE LAS BRANQUIAS (ESTADIO 22) DE <i>E. guayaco</i> . .....	49
5.2.17. MORFOLOGÍA DEL EMBRIÓN A LA ECLOSIÓN (ESTADIO 23) DE <i>E. guayaco</i> . .....	50

5.3. EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS MUSCULARES EN LOS ESTADIOS 15.75, 16, 17 Y 18 DE <i>E. guayaco</i> .....	50
6. DISCUSIÓN.....	52
6.1 TAMAÑO DE POSTURA, MORFOLOGÍA DEL HUEVO Y TIEMPOS DEL DESARROLLO. ....	52
6.2 ETAPAS DEL DESARROLLO DE <i>Engystomops</i> .....	53
6.2.1 MORFOLOGÍA DEL CLIVAJE Y BLÁSTULA DE <i>E. guayaco</i> .....	53
6.2.2 MORFOLOGÍA DE LA GÁSTRULA Y MODO DE GASTRULACIÓN EN <i>E. guayaco</i> .....	55
6.2.3 NEURULACIÓN EN <i>E. guayaco</i> (ESTADIOS 14-16) .....	58
6.2.4 MORFOLOGÍA DE LA YEMA DE LA COLA Y EMBRIONES AVANZADOS (17-23) .....	60
6.3 PIGMENTACIÓN EN LOS EMBRIONES DE <i>Engystomops</i> .....	61
6.4 EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS MUSCULARES EN <i>E. guayaco</i> .....	63
6.5 IMPORTANCIA DEL ESTUDIO DEL DESARROLLO TEMPRANO DE <i>E. guayaco</i> .....	65
7. LITERATURA CITADA.....	67
8. FIGURAS .....	73
9. TABLAS.....	112
10. ANEXOS.....	121



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Resumen del desarrollo temprano de <i>E. guayaco</i> . .....	77
Figura 2. Postura de <i>E. guayaco</i> .....	78
Figura 3. Morfología del clivaje de <i>E. guayaco</i> (estadios 1, 2 y 3).....	80
Figura 4. Morfología del estadio de 32 células de <i>E. guayaco</i> (estadio 6).....	82
Figura 5. Morfología del estadio de blástula de células grandes de <i>E. guayaco</i> en comparación con <i>E. coloradum</i> (estadio 7) .....	84
Figura 6. Morfología del estadio de blástula de células medianas de <i>E. guayaco</i> en comparación con <i>E. coloradum</i> (estadio 8) .....	86
Figura 7. Morfología de la gástrula temprana de <i>E. guayaco</i> (estadio 10) .....	88
Figura 8. Morfología del estadio de gástrula media de <i>E. guayaco</i> (estadio 11) .....	90
Figura 9. Morfología de la gástrula tardía de <i>E. guayaco</i> (estadio 12) .....	92
Figura 10. Morfología de la gástrula tardía de <i>E. guayaco</i> (estadio 12.5) .....	94
Figura 11. Morfología de la post-gástrula de <i>E. guayaco</i> (estadio 13) .....	96
Figura 12. Morfología del estadio de néurula temprana de <i>E. guayaco</i> (estadio 14) .....	98
Figura 13. Morfología del estadio de néurula media de <i>E. guayaco</i> (estadio 15).....	100
Figura 14. Morfología del estadio de néurula tardía de <i>E. guayaco</i> (estadio 16).....	102
Figura 15. Morfología del estadio de yema de la cola de <i>E. guayaco</i> (estadio 17).....	104
Figura 16. Morfología del estadio de respuesta muscular de <i>E. guayaco</i> (estadio 18)	106

Figura 17. Morfología del estadio de la yema de las branquias de <i>E. guayaco</i> (estadio 19).....	107
Figura 18. Morfología del estadio de desarrollo completo de las branquias de <i>E. guayaco</i> (estadio 22).....	108
Figura 19. Morfología de los embriones a eclosionar de <i>E. guayaco</i> (estadio 23) .....	109
Figura 20. Expresión de proteínas musculares en los estadios 15.75, 16, 17 y 18 de <i>E. guayaco</i> .....	111

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Posturas obtenidas de <i>E. guayaco</i> .....	113
Tabla 2. Tiempos del desarrollo en horas y días de los embriones de <i>E. guayaco</i> .....	114
Tabla 3. Tiempo de gastrulación en horas de los embriones de <i>E. guayaco</i> .....	115
Tabla 4. Comparación entre el diámetro del huevo y tiempos del desarrollo en varias especies de anuros .....	116
Tabla 5. Lista de fotografías y créditos .....	117

## LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Tabla del desarrollo de <i>Engystomops</i> (Romero-Carvajal <i>et al.</i> , 2009).....	122
Anexo 2. Morfología del desarrollo temprano de los embriones de <i>E. randi</i> y <i>E. coloradorum</i> .....	123
Anexo 3. Movimientos morfogenéticos de los tejidos durante la gastrulación en <i>Xenopus laevis</i> .....	124
Anexo 4. Patrones de Gastrulación.....	125
Anexo 5. Morfología de la formación del tubo neural .....	126
Anexo 6. Pigmentación en huevo y blástula media de los embriones de <i>Xenopus laevis</i> y varias especies del género <i>Engystomops</i> .....	127

## 1. RESUMEN

El presente estudio propone la descripción morfológica del desarrollo temprano desde el clivaje hasta la eclosión de los renacuajos, de *Engystomops guayaco*, en comparación con la tabla del desarrollo del género *Engystomops* y los patrones de desarrollo descritos para *Xenopus laevis*. Tomando los datos detallados en estudios previos de *Engystomops randi* y *Engystomops coloradum*, se realizó un análisis comparativo entre la morfología externa e interna, mediante el seccionamiento de embriones, tinción de núcleos e inmunodetección de proteína muscular con el anticuerpo monoclonal 12/101. La rana *E. guayaco* comparte el mismo patrón de gastrulación con las especies de desarrollo rápido: *X. laevis*, *E. randi* y *E. coloradum*. En estas especies, el alargamiento del arquenterón ocurre a partir de la gástrula temprana y la presencia del notocordio durante la gástrula tardía. En *E. guayaco* la expresión de proteína muscular se detectó a partir de la néurula media (estadio 15.75) en los somitas más rostrales.

Este estudio demuestra que al contrastar el desarrollo rápido presente en *E. guayaco*, *E. randi* y *E. coloradum*, se encuentra un patrón similar de desarrollo entre estas ranas. Estas similitudes entre el desarrollo pueden ser explicadas por la semejanza de sus modos reproductivos y su cercanía filogenética.

Palabras claves: Desarrollo rápido, *Engystomops guayaco*, proteína muscular, somitas.

## 2. ABSTRACT

This study describes the early development, from cleavage to tadpole hatching in *Engystomops guayaco*, compared to the developmental table of *Engystomops* and the developmental patterns of *Xenopus laevis*. The external and internal morphology of the embryonic development of *E. guayaco* was compared with the species previously described *Engystomops randi* and *Engystomops coloradorum*. The embryo morphology of *E. guayaco* was evaluated in whole mounts, vibratome sections, fluorescent staining for cell nuclei and immunostaining for muscular proteins using the monoclonal antibody 12-101. The gastrulation pattern of *E. guayaco* resembles the pattern of the species with rapid development such as *E. randi*, *E. coloradorum* and *X. laevis*. In these species the archenteron elongation begins in the early gastrula and the notochord elongation in the late gastrula. In *E. guayaco*, the expression of muscular protein was detected from mid neurula (stage 15.75) in the rostral somites.

The developmental pattern that is present in *E. guayaco* and other *Engystomops* species may be related to the reproductive mode of the túngara frogs and the phylogenetic closeness of these species.

Key words: Rapid development, *Engystomops guayaco*, muscular protein, somites

### 3. INTRODUCCIÓN

Los anfibios han sido durante mucho tiempo los organismos modelo para estudios de Biología del Desarrollo, presentan adaptaciones reproductivas, bases celulares y moleculares para comparar el desarrollo embrionario de diferentes especies (Duellman y Trueb, 1986; Elinson y del Pino, 2012). Se han descrito varias ventajas que presentan los anfibios para estudios del desarrollo embrionario como: el gran tamaño del huevo, la facilidad de su manipulación y la gran cantidad de huevos que se pueden obtener en condiciones de laboratorio (Browder e Item, 1998). El desarrollo embrionario temprano en anuros, comprende los estadios desde la fertilización del huevo hasta la eclosión de los renacuajos y ha sido estudiado y descrito sobre la base del organismo modelo de la biología del desarrollo *Xenopus laevis* (Pipidae) (Gilbert, 2010).

El desarrollo temprano de *X. laevis* inicia con la fertilización del huevo, en este proceso la entrada del espermatozoide puede ocurrir en cualquier lugar del hemisferio animal (Gilbert, 2010). Una vez que termina la fertilización, ocurre un arreglo en los microtúbulos del huevo en función del punto de entrada del espermatozoide. Durante la rotación cortical, el citoplasma cortical gira 30° con respecto al citoplasma interno, determinándose el eje dorso-ventral del embrión (Wolpert *et al.*, 2007; Gilbert, 2010). El clivaje en *X. laevis* es radial-holoblástico y consiste de una serie de divisiones mitóticas celulares simultáneas sin aumento en el tamaño de los blastómeros (Niewkoop y Faber, 1994). El resultado de las divisiones mitóticas durante el proceso de clivaje y del transporte de iones hacia el interior del embrión, forma una cavidad llena de líquido en el polo animal, conocida como blastocele. El embrión de *X. laevis* se denomina blástula cuando la cavidad del blastocele aparece. Esta cavidad permite la migración de

las células durante la gastrulación, evitando una interacción temprana entre células de la región vegetal y del techo del blastocele (Gilbert, 2010). En el estadio de blástula, después del 12vo clivaje, ocurre la transición de la blástula media (MBT, por sus siglas en inglés). En esta etapa se inicia la transcripción de la mayoría de genes cigóticos, el ciclo celular adquiere las fases G1 y G2 y los blastómeros adquieren la capacidad de ser móviles (Gilbert, 2010). Durante el estadio de blástula tardía ocurre la inducción del mesodermo, un proceso importante para los vertebrados debido a que está estrechamente relacionado con los movimientos morfogenéticos de la gastrulación (Wolpert *et al.*, 2007). Las células de mesodermo se ubicarán en la zona marginal de involución (IMZ, por sus siglas en inglés), las células del polo animal superior darán origen al ectodermo y las células de la región inferior del polo vegetal darán origen al endodermo (Gilbert, 2010).

El modelo de la inducción del mesodermo involucra cuatro distintas vías de señalización molecular y especifica el patrón dorso-ventral del mesodermo (Gilbert, 2010). La inducción por la región vegetal, supone señales de dos clases: la primera de la región vegetal y la segunda en el lado dorsal de la región del centro de Nieuwkoop. La primera señal especifica el mesodermo ventral mediante las señales de *VegT*, *Nodal*, *Derriere*, *Activin* y otros miembros de la superfamilia TGF- $\beta$ . La señal dorsal utiliza la vía canónica de señalización de Wnt y especifica al organizador de Spemann y al mesodermo dorsal. La tercera señal se origina en el organizador y dorsaliza al mesodermo adyacente mediante las proteínas *Noggin*, *Chordin*, *Follistatin*, *Frizzled* y *Cerberus*, al inhibir la acción ventralizante de la cuarta señal. Estas proteínas ayudan a diferenciar el tejido en mesodermo dorsal. La cuarta señal proviene de la región ventral y es impulsada por *BMP4* y *Xwnt8* (Heasman, 2006; Wolpert *et al.*, 2007; Gilbert,



2010). La transición de la blástula media y la inducción mesodermal son requisitos importantes para que ocurra la gastrulación (Gilbert, 2010).

En *X. laevis* la gastrulación inicia en el lado vegetal-dorsal de la zona marginal de involución (IMZ). Las células ubicadas en esta zona, cambian de forma drásticamente y adquieren una forma de botella. Este cambio de forma de las células causa la formación de una pequeña constricción en la superficie de la blástula conocida como surco blastoporal, el cual corresponde al organizador de Spemann (Wolpert *et al.*, 2007; Gilbert, 2010). La gastrulación tiene como objetivo llevar a las capas germinales prospectivas hacia posiciones definitivas dentro del embrión mediante movimientos morfogenéticos. Las capas germinales son: ectodermo, mesodermo y endodermo (Wolpert *et al.*, 2007). El ectodermo prospectivo recubrirá la superficie externa del embrión y dará origen al sistema nervioso y a la piel. El endodermo prospectivo recubrirá las cavidades internas y formará el intestino, pulmones, hígado entre otros tejidos. El mesodermo prospectivo que se encuentra entre las dos capas, dará lugar a tejidos como músculo, sangre, somitas y notocordio (Salazar-Ciudad *et al.*, 2003; Gilbert, 2010).

Los movimientos predominantes de la gastrulación son: involución, epíbole y convergencia y extensión dorsales (Wolpert *et al.*, 2007). Estos procesos están encargados de transformar al embrión, de un grupo de células a un renacuajo alargado, con los ejes dorso-ventral y antero-posterior totalmente diferenciados, en relación con el plan general del cuerpo del animal (Bauer *et al.*, 1994). La involución consiste en el cambio de forma de las células del blastoporo y su desplazamiento hacia el interior del embrión. Como consecuencia, existe un movimiento continuo de la capa de células vegetales, las cuales se van a diferenciar en mesodermo y endodermo, a través del labio dorsal del blastoporo durante la gastrulación (Wolpert *et al.*, 2007; Gilbert, 2010). Al

mismo tiempo que las células se encuentran en involución, ocurre epíbole de las células que no involucionan. Este proceso está mediado por la intercalación radial celular, que toma lugar en el techo del blastocele. En la epíbole ocurre intercalación entre células ectodermales profundas y superficiales, de tal manera que el ectodermo recubrirá a todo el embrión (Keller *et al.*, 2003; Keller y Shook, 2004). Una vez que las células del mesodermo y endodermo han ingresado, ocurre la convergencia y extensión dorsales. Este movimiento provoca que varias capas de células se desplacen y alcancen una disposición alargada, en la dimensión anteroposterior y estrecha en la dimensión medio lateral (Keller *et al.*, 2003). En vertebrados, la convergencia y extensión dorsales son procesos que permiten la extensión del notocordio y el alargamiento del arquenterón (Shook *et al.*, 2004). Al final de la gastrulación, la región más dorsal del ectodermo se diferencia en la placa neural, lo que marca el inicio de la neurulación (Wolpert *et al.*, 2007; Gilbert, 2010).

La neurulación es un proceso que se evidencia con la formación de los pliegues neurales en los bordes de la placa neural. En *X. laevis* la placa neural se alarga en el eje rostro-caudal y los pliegues neurales se elevan en los extremos de la misma, se juntan en la línea media y se fusionan para formar el tubo neural (Wolpert *et al.*, 2007). La placa neural es la región del ectodermo que se encuentra por encima del notocordio y dará origen al tubo neural, precursor del sistema nervioso (Gilbert, 2010).

Una vez que el tubo neural se ha cerrado, durante el desarrollo avanzado, en los estadios de organogénesis, las capas germinales interactúan entre sí para dar origen a tejidos completos y órganos, mientras los embriones toman la forma de renacuajos (Wolpert *et al.*, 2007). Los patrones de clivaje, formación de la blástula, gastrulación y neurulación observados en varias especies de anuros con desarrollo rápido son semejantes a los patrones de desarrollo embrionario que presenta *X. laevis*. En cambio

se presentan diferencias en el tiempo de ocurrencia de ciertos patrones morfogenéticos, como la convergencia y extensión dorsales en ranas cuyo desarrollo es lento (Wolpert *et al.*, 2007; Elinson y del Pino, 2012).

Estudios previos han encontrado diferencias en los eventos de gastrulación de distintas especies de anuros. La gastrulación es un proceso que ha evolucionado dentro del grupo de los anfibios junto con las diferentes estrategias reproductivas (del Pino *et al.*, 2007). Por lo tanto, los estudios del desarrollo embrionario en anuros, que difieren en sus modos reproductivos, han generado evidencia de la existencia de modificaciones en los patrones del desarrollo (del Pino *et al.*, 2007). Los rasgos diferenciales en la gastrulación de varias especies de anuros, fueron estudiados mediante análisis de la expresión de las proteínas *brachyury* como marcador del mesodermo prospectivo y *lhx1* como marcador del mesodermo prospectivo, mesodermo axial y del sistema nervioso central (Elinson y del Pino, 2012). El gen *brachyury* es altamente conservado entre los vertebrados, sugiriendo que juega un papel importante en la especificación del mesodermo y en los movimientos de gastrulación (Smith *et al.*, 1991). En *X. laevis* la expresión más temprana de *brachyury* (*xbra*), ocurre en la transición de la blástula-media, pero la expresión más fuerte sucede en las células profundas de la región ecuatorial, en la gástrula temprana (Tada y Smith, 2001). El gen *xbra* se expresa en las células del mesodermo presuntivo alrededor del labio del blastoporo (Smith *et al.*, 1991; Smith *et al.*, 1995; Benítez y del Pino, 2002). La expresión de este gen produce, además, una señal que marca la zona de elongación dorsal en el notocordio y, por lo tanto, el inicio de la extensión convergente (Smith *et al.*, 1991; Benítez y del Pino, 2002).

Estudios comparativos realizados en ranas ecuatorianas han categorizado el desarrollo embrionario de ranas en dos grupos, especies con desarrollo rápido y especies

con desarrollo lento, en donde se definió a la velocidad del desarrollo temprano como el tiempo que tarda un embrión desde la fertilización hasta el final de la gastrulación (del Pino *et al.*, 2007). Los tiempos requeridos para alcanzar la gastrulación varían entre las especies. Las ranas *X. laevis*, *E. randi*, *E. coloradum* (Leptodactylidae) (del Pino *et al.*, 2007; Romero-Carvajal *et al.*, 2009) y las especies que depositan los embriones suspendidos en la vegetación como: *Hyalinobatrachium fleischmanni* y *Espadarana callistomma* (Centrolenidae), presentan desarrollo rápido (Salazar-Nicholls y del Pino, 2015). En estas especies el alargamiento del notocordio y el cerramiento del blastoporo, son eventos que se solapan durante la gastrulación, en contraste, con el desarrollo embrionario de ranas como: *Epipedobates machalilla* (Dendrobatidae) y la rana marsupial *Gastrotheca riobambae* (Hemiphractidae) que presentan desarrollo lento. En estas especies el alargamiento del notocordio está retrasado, hasta después del cerramiento del blastoporo, proceso que ocurre después de la gastrulación (del Pino, 1996; Moya *et al.*, 2007; Romero-Carvajal *et al.*, 2009; Venegas-Ferrin *et al.*, 2010; Elinson y del Pino, 2012).

Los modos reproductivos en los anfibios, muestran una diversidad mayor que cualquier otro grupo de vertebrados, sugiriendo que la gran diversidad de modos reproductivos en anfibios está relacionada con la exposición de los embriones a los diversos ambientes externos y a su larga historia filogenética del grupo (Wake, 2003; Elinson y del Pino, 2012). La clasificación de los modos reproductivos en anuros, se ha basado en características tales como: sitio de deposición de los huevos, tipo de huevos y su modo de desarrollo. Este esquema ha sido usado ampliamente con algunas modificaciones (Wells, 2007). Se ha reportado que existen 39 modos reproductivos en los anuros, incluyendo especies que presentan reproducción acuática, fertilización

interna, la construcción de nidos de espuma, reproducción terrestre, la incubación de los huevos en el cuerpo del adulto y el desarrollo directo del embrión (Wells, 2007).

Las ranas que presentan desarrollo lento, como es el caso de *G. riobambae* y *E. machalilla* muestran diferencias en su desarrollo temprano en comparación con *X. laevis* (del Pino *et al.*, 2004). La rana marsupial *G. riobambae* presenta una bolsa de integumento localizada en la espalda de la madre, donde incuba aproximadamente 120 huevos, hasta que las crías nacen como renacuajos avanzados. El diámetro del huevo es de 3 mm (del Pino y Escobar, 1981). La rana *E. machalilla* deposita los huevos en nidos terrestres y presenta cuidado parental, donde el macho cuida los huevos después que la hembra abandona el nido. Esta especie deposita alrededor de 15 embriones por postura y el tamaño del huevo es de 1.6 mm de diámetro (Duellman y Trueb, 1994; del Pino *et al.*, 2004). Las especies con desarrollo rápido, presentan estrategias reproductivas acuáticas (Salazar-Nicholls y del Pino, 2015). Esta estrategia reproductiva es la más común y está presente en alrededor del 80% de las familias de anuros (Duellman y Trueb, 1986). La rana *X. laevis* tiene hábito acuático durante todo su desarrollo y la etapa adulta, características que la diferencian del resto de anuros. Esta rana deposita miles de huevos con un diámetro de 1.2 mm aproximadamente (Niewkoop y Faber, 1994). Otras especies de anfibios han desarrollado adaptaciones que disminuyen o eliminan el requerimiento acuático para la reproducción (Duellman y Trueb, 1986). *Engystomops randi* y *E. coloradum*, presentan un modo reproductivo que consiste en la construcción de un nido de espuma, donde depositan aproximadamente 120-130 huevos por postura. El diámetro aproximado del huevo es de 1.1 y 1.3 mm, respectivamente (Romero-Carvajal *et al.*, 2009). La formación de un nido de espuma flotante, es una de las adaptaciones reproductivas más estudiadas en las ranas túngaras del género *Engystomops*.

Las especies del género *Engystomops* depositan sus huevos en nidos de espuma individuales o comunales, que flotan sobre aguas estancadas (Dalgetty y Kennedy, 2010). Estos nidos se forman durante el amplexus, en donde los machos baten con sus extremidades posteriores el fluido de gelatina secretado por la hembra junto con los huevos. Los nidos de espuma protegen el desarrollo embrionario hasta la eclosión de los renacuajos (Cooper *et al.*, 2005; Mackenzie *et al.*, 2009).

La estrategia de depositar los huevos en nidos de espuma comunales sobre piscinas temporales genera un aprovechamiento del material del nido, disminuye del gasto energético y el tiempo de exposición de los embriones a posibles depredadores, incluidos los renacuajos de otras ranas (Höld, 1990; Romero-Carvajal *et al.*, 2009; Dalgetty y Kennedy, 2010). La superficie endurecida del nido refleja la radiación solar, lo cual posiblemente disminuye la absorción de calor, previene la desecación interna del nido e impide la degradación microbiana (Romero-Carvajal *et al.*, 2009; Elinson y del Pino, 2012). El componente principal de la espuma del nido es la proteína surfactante ranaspumin-2 (Rsn-2). Esta proteína es capaz de bajar la tensión superficial del agua. Esta característica permite al nido de espuma mantenerse a flote en piscinas temporales. La proteína Rsn-2 es biocompatible con los huevos, el esperma y con el desarrollo de los embriones de las ranas de este género (Cooper *et al.*, 2005; Mackenzie *et al.*, 2009; Elinson y del Pino, 2012).

Los huevos de todas las especies del género *Engystomops* hasta ahora estudiadas son de color blanquecino, con apariencia similar a los huevos albinos en *X. laevis*; sin embargo los huevos de *Engystomops* poseen pigmentación oscura alrededor de sus núcleos (Romero-Carvajal *et al.*, 2009; Dalgetty y Kennedy, 2010). Los huevos de los anfibios que se desarrollan a larvas acuáticas, usualmente tienen pigmento en la región animal del huevo, donde residen los núcleos celulares animales. El pigmento puede ser

marrón oscuro o negro como en varias especies del género *Rana* y *Bufo*, o marrón como lo observado para *X. laevis*, *E. randi* y *E. coloradum* (Romero-Carvajal *et al.*, 2009; Elinson y del Pino, 2012).

La acumulación de gránulos de pigmento en la corteza animal de los oocitos en *X. laevis*, depende de la expresión proteica de *shroom2*, una proteína de unión a la actina (Elinson y del Pino, 2012). La proteína *shroom2* junto con la espectrina, una membrana asociada a los elementos citoesqueléticos del aparato de Golgi y a vesículas citoplasmáticas, juegan un papel importante en el transporte de pigmento durante la ovogénesis y la blástula temprana en *X. laevis*. En los embriones tempranos de *X. laevis*, la sobreexpresión de *shroom2* incrementa la expresión de espectrina, acumulándose en la corteza, donde se localiza la expresión ectópica de *shroom2*. Este proceso induce la acumulación de espectrina y la pigmentación de las células epiteliales en *X. laevis* (Lee *et al.*, 2009).

Las variaciones que ocurren en los niveles de expresión de *shroom2* y de espectrina podrían subyacer variaciones del pigmento en los anfibios, como lo observado en *Engystomops pustulosus*, *E. randi* y *E. coloradum*. En estas especies, el pigmento se localiza en la región perinuclear en los embriones en estadio de blástula temprana. Los niveles del ARNm de *shroom2* son muy bajos, comparado con los altos niveles observados en *Xenopus* (Lee *et al.*, 2009). Por lo tanto, los cambios en el patrón de nivel de expresión o la localización de *shroom2* y espectrina, generarían variación interespecífica en el patrón de pigmentación de los huevos de *X. laevis*, varias especies del género *Engystomops* y en general de todos los anfibios (Lee *et al.*, 2009).

En este estudio se analizó el desarrollo de la rana *Engystomops guayaco* (Anura: Leptodactylidae). La rana *E. guayaco*, al igual que otras ranas de este género es también conocida como “rana túngara”, habita en el suelo de bosques primarios húmedos secos y

en bosques secundarios. *Engystomops guayaco* es una especie nativa del Ecuador y se distribuye en bosques costeros deciduos y semideciduos de tierras bajas, en áreas intervenidas. Su distribución va desde los 32 hasta los 92 m.s.n.m, al este de la provincia del Guayas, oeste del Ecuador (Ron *et al.*, 2004; Stuart, 2010). Las ranas *E. guayaco* y *Engystomops montubio* están cercanamente relacionadas entre sí y junto a *E. randi* y *E. coloradum*, forman un clado monofilético (Ron *et al.*, 2006). Es importante ampliar el campo de investigación del desarrollo temprano de las especies del género *Engystomops*, con el propósito de conocer posibles diferencias y semejanzas del desarrollo temprano de este grupo hermano.

El presente estudio describe la morfología externa e interna del desarrollo temprano de *E. guayaco*, en comparación con el desarrollo de las especies del género *Engystomops* descritas previamente por Romero-Carvajal *et al.*, 2009 y con *X. laevis*. Esta investigación contribuye con el conocimiento del desarrollo embrionario y la biología de esta especie, como una herramienta para futuros estudios comparativos que se realicen en el Laboratorio de Biología del Desarrollo de la PUCE.



## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 OBTENCIÓN Y CULTIVO DE LOS EMBRIONES

Las posturas de *Engystomops guayaco* fueron donadas por la iniciativa de conservación de anfibios amenazados “Balsa de los sapos” de la PUCE. Los embriones fueron obtenidos del manejo *ex situ* de *E. guayaco*. Los especímenes de esta especie provienen de afluentes en la Provincia del Guayas. En el Laboratorio de Biología del Desarrollo, las posturas, fueron trasladadas a recipientes con agua libre de cloro para su incubación. Los recipientes fueron mantenidos a temperatura ambiente, dentro del laboratorio. Todas las observaciones se realizaron a una temperatura que oscilaba entre 18-23°C. Cada recipiente fue rotulado con datos que ayuden a identificar a los embriones como fecha y hora, el número de postura encontrada, la especie a la que pertenece, el estadio y la cantidad de huevos dentro de la postura.

### 4.2 PROCESAMIENTO Y FIJACIÓN DE LOS EMBRIONES

#### 4.2.1 SOLUCIONES Y FIJATIVOS

##### 4.2.1.1. SOLUCIÓN DE STEINBERG (Rugh, 1965)

- 58 mM NaCl
- 0.65 mM KCl
- 0.85 mM MgSO<sub>4</sub>
- 5 mM Tris, pH 8
- 0,34 mM Ca (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>

- Agua destilada

#### 4.2.1.2. SOLUCIÓN SALINA TAMPÓN FOSFATO (PBS)

- 1.5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$
- 7 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$
- 137.7 mM NaCl
- 2.7 mM KCl

#### 4.2.1.3. FORMALINA 10 %

- 100 ml formaldehído (37 % stock)
- 900 ml agua destilada.

#### 4.2.1.4. FIJATIVO SMITH (Smith, 1912)

##### 4.2.1.4.1. SOLUCIÓN A

- 10 gramos de dicromato de potasio ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ) en 1 litro de agua destilada.

##### 4.2.1.4.2. SOLUCIÓN B

- 200 ml formalina (37 % formaldehído)
- 50 ml ácido acético
- 750 ml agua destilada

El fijativo Smith se prepara inmediatamente antes de usar, en una proporción 1:1 de las soluciones A (4.2.1.4.1) y B (4.2.1.4.2).

#### 4.2.1.5. FIJATIVO DE MEMFA

- 0.1 M MOPS pH 7.4
- 2 mM EGTA
- 1 mM MgSO<sub>4</sub>

#### 4.2.1.6. GELATINA 7,5%

- 1,5 g gelatina “Royal” sin sabor.
- 20 ml PBS 1x (4.2.1.2).

#### 4.2.1.7. AGAROSA 6%

- 1,2 g agarosa 100%
- 20 ml PBS 1x (4.2.1.2)

### 4.2.2 PROCESAMIENTO DE LOS EMBRIONES

Los embriones de *E. guayaco* fueron manipulados y observados en la solución de Steinberg al 15% (4.2.1.1). Para las observaciones, se utilizó el estereomicroscopio WILD Heerbrugg y lámparas de fibra óptica KL 1500 (Zeiss). Para determinar el diámetro de los embriones, se utilizó el programa Axiovision 4.6.3 a partir de microfotografías tomadas con el microscopio Stemi SV6 de Carl Zeiss.

Los estadios de *E. guayaco* fueron adoptados a partir de la comparación de su desarrollo externo con la tabla del desarrollo de *Engystomops* (Romero-Carvajal *et al.*, 2009)

Los embriones en todos los estadios del desarrollo fueron fijados para su futura observación, documentación y manipulación.

#### 4.2.3 FIJACIÓN DE EMBRIONES

Para fijar los embriones de *E. guayaco* se retiró la capa de gelatina con la ayuda pinzas de relojero bajo el microscopio. Los embriones fueron manipulados en la solución salina de Steinberg 0,15x (4.2.1.1). Esta solución mantiene el pH estable e impide la deshidratación de los embriones. Este es un proceso delicado que se llevó a cabo bajo un estereoscopio WILD (Heerbrugg) e iluminación con lámparas de fibra óptica HL 1500 (Zeiss).

##### 4.2.3.1 FIJACIÓN CON SMITH

Embriones sin gelatina fueron fijados durante 24 horas en el fijativo de Smith (4.2.1.4) en frascos oscuros a temperatura ambiente. Al día siguiente, se realizaron varios lavados con agua destilada hasta eliminar el exceso de fijativo. Finalmente, los embriones se guardaron en tubos Eppendorf de 1.5 ml con 600 µl de formalina 10 % (4.2.1.3) y 900 µl de PBS 1X (4.2.1.2), a 4 °C. El fijativo de Smith se utiliza para preservar la morfología interna de los embriones y evitar el colapso de sus cavidades internas.

##### 4.2.3.2. FIJACIÓN CON MEMFA

El fijativo de MEMFA se prepara elaborando una solución al 10% de MEMFA 10X (4.2.1.5) y 10 % de formaldehído 37 % (4.2.1.6), en agua destilada. Los embriones sin gelatina, fueron fijados durante 1 horas en el fijativo de MEMFA.

Los Embriones sin membrana vitelina fueron incubados en el fijativo por dos horas y media, a temperatura ambiente. Finalmente, fueron almacenados en metanol 100% a -20 °C hasta ser requeridos para realizar ensayos de inmunodetección proteica.

### **4.3 OBSERVACIÓN DE LA MORFOLOGÍA Y ESTRUCTURA INTERNA DE LOS EMBRIONES.**

#### **4.3.1 BISECCIONES**

Los embriones en los estadios seleccionados, previamente fijados en el fijativo de Smith (4.1.1.4), fueron embebidos en glicerol y seccionados en su parte media usando un bisturí. Cada una de las mitades fue conservada en una mezcla 2:3 de Formalina 10% (4.2.1.3) y PBS 1X (4.2.1.2), a 4 °C hasta ser requeridas.

#### **4.3.2 SECCIONES EN VIBRATOMO**

Los embriones enteros y las bisecciones de los embriones de *E. guayaco* fueron embebidas en gelatina 7.5% (4.2.1.6) e incubados por 4 horas a 45 °C con el fin de evitar que las células se desprendan durante el seccionamiento e impedir el colapso de cavidades internas.

Luego los embriones fueron trasladados a una caja con agarosa líquida al 6% (4.2.1.7). Cuando el gel de agarosa se solidificó, se cortó un cubo de agarosa que contenía al embrión. El cubo de agarosa fue adherido, con pegamento instantáneo marca Loctite (Super-Bonder), a un porta-tejidos. El porta-tejidos fue asegurado en la plataforma del Vibratomo Oxford. El contenedor del Vibratomo se llenó con 600ml de

agua destilada para recoger las secciones. Se realizaron secciones sagitales, transversales y horizontales de 40 µm de espesor, utilizando una cuchilla metálica de la marca Gillette. Las secciones fueron realizadas a una velocidad 2.5 y amplitud 6 con un ángulo de inclinación de 25°. Las secciones obtenidas fueron transferidas y almacenadas en una solución de Glicerina y Formalina 1:1 PBS 1x (4.2.1.2) y formalina 10% (4.2.1.3.) y fueron guardadas a 4 °C hasta su posterior estudio y registro fotográfico.

#### 4.3.3. TINCIÓN FLUORESCENTE PARA NÚCLEOS CON HOECHST 33258

Las secciones de Vibratomo fueron teñidas con el tinte fluorescente Hoechst 33258, el cual se adhiere al ADN de los núcleos celulares haciendo posible su observación gracias a iluminación fluorescente. Las secciones fueron lavadas con PBS (4.2.1.2) y colocadas en pocillos de plástico. Fueron incubadas por 20 minutos en una solución de 1 µl de Hoechst 33258 en 1 ml de PBS (4.2.1.2). La incubación se realizó a temperatura ambiente y en oscuridad. Posteriormente, las secciones fueron lavadas 5 veces con PBS 1x (4.2.1.2), y almacenadas en glicerol. Finalmente, se preparó el montaje, de las secciones teñidas, en placas. Las secciones fueron transferidas a un portaobjetos de cristal con una gota de glicerina, y fueron cubiertas con un cubreobjetos. Las placas fueron almacenadas a -20 °C, hasta ser observadas y fotografiadas.

### 4.4. INMUNODETECCIÓN EN MONTAJE ENTERO

#### 4.4.1. SOLUCIONES, TAMPONES Y ANTICUERPOS

##### 4.4.1.1. Tampón 10mM Tris/ 1mM EDTA pH 9.0:

Para un volumen final de 100 ml

- 0.121 g de TRIS
- 0.037 g de EDTA
- 100 ml de agua destilada

#### 4.4.1.2. TBS-Tr

- 10 mM Tris pH 8
- 140 mM NaCl
- 0.1 % Triton-X

#### 4.4.1.3. TBTM

- TBS-Tr
- 2 mg/ml de albúmina de suero bovino (BSA)
- 5 % de leche en polvo descremada

#### 4.4.1.4. TAMPÓN DIG

- 100 mM TRIS/HCL, pH 9.5
- 100 mM NaCl
- 50 mM MgCl<sub>2</sub>

#### 4.4.1.5. TAMPÓN 4

- 10 mM Tris pH 8
- 1 mM EDTA

#### 4.4.1.6. SOLUCIÓN NBT

- 50 mg/ml NBT (Nitro Blue Tetrazolium)
- 70 % Dimetilformamida

#### 4.4.1.7. SOLUCIÓN BCIP

- 50 mg/ml BCIP (5-Bromo4-Cloro3-Indol fosfato)
- 100 % Dimetilformamida

#### 4.4.1.8. REACTIVO DE COLOR

- 33 µl solución NBT (4.5.1.6)
- 16.5 µl solución BCIP (4.5.1.7)
- 5 ml tampón DIG (4.5.1.4)

#### 4.4.1.9. BB/BA

- Benzilbenzoato: alcohol bencílico en proporción 2:1

#### 4.4.1.10. SSC

- Tampón de cloruro y citrato de sodio

#### 4.4.1.11. ANTICUERPOS

##### 4.4.1.11.1. ANTICUERPO PRIMARIO



- 12/101: Anticuerpo monoclonal desarrollado para detectar proteínas musculares de las miofibrillas. Especifica los somitas de los embriones (Hybridoma Bank Iowa, USA).

#### 4.4.1.11.2. ANTICUERPO SECUNDARIO

- Anti mouse-IgG acoplado a la enzima fosfatasa alcalina (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany).

### 4.4.2. PROCEDIMIENTO PARA LA INMUNODETECCIÓN

Para la detección de proteínas musculares, se utilizó el anticuerpo monoclonal 12/101 (4.4.1.11.1) y embriones previamente fijados con el fijativo de MEMFA (4.2.1.5). El procedimiento de inmunodetección en embriones enteros, se basó según los protocolos de Benítez y del Pino, (2002) con modificaciones recientes del laboratorio de Biología del Desarrollo de la PUCE.

#### 4.4.2.1. RECUPERACIÓN DEL ANTÍGENO

En una caja Petri de vidrio de 5 cm de diámetro se colocó el buffer de recuperación de antígeno (4.4.1.1) y se sumergió a los embriones enteros o bisectados. Se tapó la caja Petri asegurándose que los embriones queden totalmente cubiertos con el tampón. Se incubó a los embriones a 60°C en la incubadora por un periodo de 24 horas.

#### 4.4.2.2. BLOQUEO DE LA UNIÓN NO ESPECÍFICA

Para el bloqueo de unión no específica del anticuerpo, se incubó a los embriones con TBTM (4.4.1.3), durante 15 minutos a temperatura ambiente. Una vez finalizada la

incubación, se reemplazó la solución anterior con una mezcla de 20% de suero de cabra en TBTM (4.4.1.3), durante una hora aproximadamente.

#### 4.4.2.3. INCUBACIÓN DEL ANTICUERPO PRIMARIO

El anticuerpo que se utilizó fue el 12/101. El anticuerpo monoclonal 12/101 reacciona contra las proteínas de las miofibrillas, que tiene un peso molecular de 102 kDa (Kintner y Brockes, 1984).

La solución TBTM (4.4.1.3) con 20% de suero de cabra fue reemplazada por una solución de 10% de suero de cabra en TBTM (4.4.1.3), en el cual se diluyó el anticuerpo primario. La dilución del anticuerpo primario 12/101 fue 1:2. Los embriones fueron incubados en la solución con anticuerpo primario por 72 horas a 4°C. Durante este proceso el tubo contenedor de los embriones fue rotado periódicamente.

#### 4.4.2.4. LAVADO DEL ANTICUERPO PRIMARIO

Al finalizar el tiempo de incubación, se reemplazó la solución del anticuerpo primario con TBS-Tr (4.4.1.2) con esta solución se realizaron 5 lavados de cinco minutos cada uno, a temperatura ambiente. Luego, se realizaron 2 lavados cada 30 minutos, a temperatura ambiente. Finalmente se realizó un último lavado por 24 horas a 4°C.

#### 4.4.2.5. INCUBACIÓN DEL ANTICUERPO SECUNDARIO

El anticuerpo secundario utilizado fue el anti-mouse IgG acoplado a la fosfatasa alcalina. La disolución de este anticuerpo fue de 1:500.

La solución de TBS-Tr (4.4.1.2), fue reemplazada por una solución de TBTM (4.4.1.3) con 10% de suero de cabra, donde se diluyó el anticuerpo secundario anti-mouse. Los embriones fueron incubados en la solución con el anticuerpo secundario durante 24 horas a 4°C.

#### 4.4.2.6. LAVADO DEL ANTICUERPO SECUNDARIO

Al finalizar la incubación del anticuerpo secundario, se realizaron lavados con TBS-Tr (4.4.1.2). Se realizaron 5 lavados de 5 minutos cada uno, a temperatura ambiente. Luego, se realizaron 2 lavados cada 30 minutos, a temperatura ambiente. Finalmente se realizó un último lavado por 24 horas a 4°C.

#### 4.4.2.7. REACCIÓN DE COLOR

Los embriones fueron transferidos a pocillos de plástico, donde se realizaron 2 lavados de 10 minutos con tampón DIG (4.4.1.4). Luego se realizaron 2 lavados, de 10 minutos, con 5 mM de levamisol en tampón DIG (4.4.1.4). Posteriormente, los embriones fueron incubados en el reactivo de color (4.4.1.8), a temperatura ambiente y en la oscuridad.

Este proceso se llevó a cabo hasta obtener una reacción positiva. Una vez que la reacción tuvo lugar, se procedió a detenerla mediante el lavado con tampón 4 (4.4.1.5).

Finalmente, se realizaron varios lavados con PBS (4.2.1.2) y se almacenó los embriones en pocillos con glicerol.

#### **4.5. PROCESAMIENTO DE EMBRIONES INMUNOTEÑIDOS**

##### **4.5.1. DESPIGMENTACIÓN DE EMBRIONES**

Una vez terminado el proceso de inmunodetección, los embriones fueron sometidos a un proceso de despigmentación. Los embriones fueron postfijados en la solución de Smith B (4.2.1.4.2) durante 24 horas a 4°C. Esta fijación se realizó con el objetivo de evitar que la tinción desaparezca durante el proceso de despigmentación. Luego, se realizaron varios lavados con PBS (4.2.1.2). Se transfirió a los embriones a un frasco de vidrio que contenía 1% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 5% de formamida y 0.5x de SSC (4.4.1.10). El frasco fue colocado bajo la luz solar durante 15 a 20 minutos. Finalmente, se lavó los embriones con PBS (4.2.1.2) y se los almacenó en glicerina.

#### **4.6. FOTOGRAFÍA DE EMBRIONES ENTEROS, BISECCIONES, SECCIONES, PLACAS Y EMBRIONES INMUNOTEÑIDOS.**

Los embriones enteros, embriones inmunoteñidos, bisecciones y las secciones sin tinción de núcleos fueron fotografiados utilizando el estereomicroscopio Stemi SV6, de Carl Zeiss. Las imágenes fueron tomadas utilizando luz directa. Las placas con la tinción fluorescente de núcleos fueron fotografiadas utilizando un microscopio AxioObserver.Z1, de Carl Zeiss. Para todas las fotografías se utilizó una cámara

AxioCam y el programa de procesamiento de imágenes Axiovision 4.6.3. Las imágenes obtenidas fueron editadas utilizando el programa Adobe Photoshop CS6.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. EL DESARROLLO TEMPRANO DE *E. guayaco*.

El estudio del desarrollo temprano de *E. guayaco*, se basó en el análisis de los embriones de 8 posturas, con un rango de 130-190 embriones por postura (Tabla 1).

El desarrollo temprano de *E. guayaco* (Fig. 1A-M) comparte similitudes con el desarrollo temprano descrito previamente para los embriones de *E. randi* y *E. coloradum*, desde el clivaje hasta la eclosión de los renacuajos. La rana *E. guayaco* deposita sus huevos en nidos de espuma flotantes (Fig. 2A). En el desarrollo temprano de *E. guayaco* se observaron huevos de color blanco que carecen de pigmento, lo que les permite camuflarse en el nido de espuma flotante (Fig. 2B). Después de la fertilización de los huevos, los embriones atravesaron las etapas de clivaje (Figs. 3-4), blástula (Figs. 5-6), gastrulación (Figs. 7-11), neurulación (Figs. 12-14) y organogénesis, hasta la eclosión del renacuajo (Figs. 15-19).

Los tiempos del desarrollo que se muestran en la Tabla 2, corresponden al tiempo que tardan los embriones desde la fertilización hasta la eclosión de los renacuajos. Los embriones de *E. guayaco* tardan 77 horas (3 días) aproximadamente, desde la fertilización hasta eclosionar. El tiempo de gastrulación corresponde al tiempo que tardan los embriones desde la formación del labio dorsal del blastoporo hasta el cierre del blastoporo. El tiempo de gastrulación para los embriones de *E. guayaco* fue de 12 horas, el mismo que se determinó al promediar el tiempo que tardaron los embriones desde el estadio de gástrula temprana (estadio 10) hasta llegar a un estadio de post-gástrula (estadio 13) (Tabla 3).

Todos los estadios del desarrollo embrionario de *E. guayaco* desde la fertilización hasta la eclosión del renacuajo, fueron adoptados de la tabla del desarrollo del género *Engystomops* de Romero-Carvajal *et al* (2009) (Anexo 1). El análisis comparativo de las especies que presentan modos reproductivos y patrones del desarrollo diferentes, fue realizado a partir de la revisión bibliográfica, donde se pone en discusión el tamaño del huevo y tiempos del desarrollo de *E. guayaco* en comparación con varias especies de anuros (Tabla 4).

## **5.2. MORFOLOGIA EXTERNA E INTERNA DE LOS EMBRIONES DE *E. guayaco*.**

### **5.2.1. MORFOLOGIA DEL HUEVO Y CLIVAJE (ESTADIO 1-3) DE *E. guayaco*.**

Los huevos fertilizados de *E. guayaco* son pequeños y blancos (Fig. 3A). El diámetro del huevo de *E. guayaco* fue de 0.9 mm, el mismo que se estimó a partir de 3 embriones en estadio de fertilización y varios embriones en estadios de clivaje. No se pudo identificar el hemisferio animal del vegetal. En el embrión en estadio de 2 células (Fig. 3B) se observó el primer surco del clivaje. El origen del surco del clivaje ayudó a determinar el hemisferio animal del embrión. Se observó que los embriones en este estadio carecen de pigmento oscuro.

En el embrión en estadio de 4 células (Fig. 3C), la segunda división celular ocurrió 20 minutos después de haber iniciado el proceso de clivaje (Tabla 2). Se

observó que el segundo surco del clivaje ocurre de manera perpendicular al primer surco. Hacia el final de este estadio se observó un embrión con 4 células iguales.

### 5.2.2. MORFOLOGIA Y ESTRUCTURA INTERNA DEL EMBRIÓN EN ESTADIO DE 32 CÉLULAS (ESTADIO 6) DE *E. guayaco*.

La figura 4A es un esquema de la morfología externa de los embriones del estadio de 32 células. En el embrión en estadio de 32 células (Fig. 4B) se observó la asimetría de las divisiones celulares en los macrómeros del embrión, observados en el hemisferio vegetal. Se observó que los micrómeros (Fig. 4C) poseen células más pequeñas que los macrómeros. No se observó pigmento alrededor de los núcleos. Se observó la pequeña cavidad del blastocelo en la bisección de un embrión de este estadio (Fig. 4D).

### 5.2.3. MORFOLOGIA DE LA BLÁSTULA DE CÉLULAS GRANDES (ESTADIO 7) DE *E. guayaco*.

La figura 5A es un esquema comparativo de la morfología externa de los embriones de *E. guayaco* correspondientes al estadio de blástula de células grandes. En los embriones de *E. guayaco* y *E. coloradum* en estadio de blástula de células grandes se pudo distinguir la diferencia de tamaño entre las células del hemisferio animal y vegetal (Fig. 5B-E). Se observó la presencia de pigmento alrededor de los núcleos en el embrión entero y en la sección sagital de *E. guayaco* y *E. coloradum* (Figs. 5B-E). Se observó que el blastocelo es de mayor tamaño que en el estadio de 32 células. El



blastocole se encuentra desplazado hacia la región animal del embrión. Las células del techo del blastocole mostraron pigmento alrededor de los núcleos, al igual que las células de la región animal y vegetal.

#### 5.2.4. MORFOLOGIA DE LA BLÁSTULA DE CÉLULAS MEDIANAS (ESTADIO 8) DE *E. guayaco*.

La figura 6A es un esquema comparativo de la morfología externa de los embriones correspondientes al estadio de blástula de células medianas. En este estadio se observó una disminución de tamaño de las células del hemisferio animal y vegetal (Fig. 6B y 6D). La imagen en la figura 6B muestra la presencia de pigmento alrededor de los núcleos de pocas células. En la bisección sagital de ambas especies (Fig. 6C y 6E) se observó un aumento en el tamaño del blastocole, localizado en la región animal del embrión. Se observó pigmento alrededor de los núcleos en el techo del blastocole y pocos núcleos pigmentados en la región vegetal del embrión.

#### 5.2.5. MORFOLOGIA Y ESTRUCTURA INTERNA DE LA GÁSTRULA TEMPRANA. ESTADIO: LABIO DORSAL DEL BLASTOPORO (ESTADIO 10) DE *E. guayaco*.

La figura 7A es un esquema de la morfología externa de los embriones del estadio de gástrula temprana. En estos embriones se observó el labio dorsal del blastoporo como una hendidura curva oscura en la región sub-ecuatorial del embrión (Fig. 7B).

En la sección sagital (Fig. 7C) se observó el blastocele extendido sobre toda la región animal del embrión. La figura 7D es una sección sagital teñida para tinción fluorescente de núcleos, en donde se observó el labio dorsal del blastoporo como una hendidura curva en la región subecuatorial del embrión. La figura 7E corresponde a un acercamiento del labio dorsal del blastoporo, se observaron células en forma de botella cerca de esta hendidura curva. En un acercamiento del techo del blastocele de una sección sagital con fluorescencia nuclear (Fig. 7F) se observó que el techo está formado por 5-6 capas de células.

#### 5.2.6. MORFOLOGIA Y ESTRUCTURA INTERNA DE LA GÁSTRULA MEDIA. ESTADIO: TAPÓN DE YEMA GRANDE (ESTADIO 11) DE *E. guayaco*.

La figura 8A es un esquema de la morfología externa de los embriones del estadio de gástrula media. En la gástrula media (Fig. 8B) el labio del blastoporo circunda a un gran tapón de yema. En la sección sagital (Fig. 8C) se observó el labio dorsal y ventral del blastoporo a los costados del tapón de yema. La sección sagital (Fig. 8D) teñida para núcleos, se observó el cleft de Brachet en la zona dorsal y ventral del embrión. Las secciones permitieron observar una reducción en el tamaño del blastocele, producto de la invasión del techo del blastocele por las células vegetales. La figura 8E corresponde a un acercamiento del labio dorsal del blastoporo. Se observó el arquenterón, como una cavidad que comienza a expandirse. En un acercamiento del techo del blastocele de una sección sagital teñida con fluorescencia nuclear (Fig. 8F) se observó que el techo está formado por 3-4 capas de células.

### 5.2.7. MORFOLOGIA Y ESTRUCTURA INTERNA DE LA GÁSTRULA TARDÍA. ESTADIO: TAPÓN DE YEMA MEDIANO (ESTADIO 12) DE *E. guayaco*.

La figura 9A es un esquema de la morfología externa de los embriones del estadio de gástrula tardía. El tapón de yema en este estadio (Fig. 9B), mostró una reducción de casi un tercio de su tamaño en el estadio de gástrula media. Se observó el surco neural recorriendo la línea media dorsal del embrión (Fig. 9B). La sección sagital (Fig. 9C) muestra que el arquenterón presenta una mayor expansión, al igual que el arquenterón de la región ventral. La imagen en la figura 9D corresponde a una tinción de núcleos de la sección sagital, se observaron el techo del arquenterón y el cleft de Brachet. Se consideró a la capa superficial del techo del arquenterón como ectodermo y a la capa interna que está recubriendo al arquenterón como endo-mesodermo.

### 5.2.8. MORFOLOGIA Y ESTRUCTURA INTERNA DE LA GÁSTRULA TARDÍA (ESTADIO 12.5) DE *E. guayaco*.

La figura 10A es un esquema de la morfología externa de los embriones del estadio de gástrula tardía. En este estadio se observó una reducción considerable del tapón de yema (Fig. 10B). La figura 10C corresponde a una tinción fluorescente de núcleos de una sección transversal posterior, que muestra la ubicación de las capas germinales respecto al arquenterón. En este estadio, se observó que el arquenterón presenta un aumento en su tamaño. El notocordio se observó como un paquete central de células que se diferencia del mesodermo paraxial, a ambos lados. La figura 10D es

una magnificación del techo del arquenterón de la figura 10C. Se observó el recubrimiento endodermal del arquenterón, mesodermo paraxial a los costados del notocordio y ectodermo de la piel.

#### 5.2.9. MORFOLOGIA Y ESTRUCTURA INTERNA DE LA POST-GÁSTRULA (ESTADIO 13) DE *E. guayaco*.

Las figura 11A y 11B son esquemas de la morfología externa de los embriones del estadio de post-gástrula en los que se indican los planos de seccionamiento. En este estadio el tapón de yema ha desaparecido por completo y en su lugar se observó el blastoporo cerrado por la fusión del labio dorsal y ventral del blastoporo (Fig. 11C). El blastoporo es alargado y en forma de ranura. Se observó el surco neural como una estructura que nace en el blastoporo y recorre la línea media dorsal del embrión (Fig. 11C). Además, se observó la placa neural. La figura 11D corresponde a una tinción fluorescente de núcleos de una sección sagital, que muestra un engrosamiento en la región dorsal-anterior del embrión, que corresponde a neuroectodermo. También se observó el alargamiento de la porción ventral del arquenterón. En la sección transversal caudal con tinción para núcleos (Fig. 11E), se observó la placa neural y se pudo diferenciar las capas germinales: el ectodermo en la superficie externa, mesodermo diferenciado en mesodermo paraxial y notocordio y el endodermo en contacto con el arquenterón.

#### 5.2.10. MORFOLOGÍA Y ESTRUCTURA INTERNA DE LA NÉURULA TEMPRANA (ESTADIO 14) DE *E. guayaco*.

La figura 12A es un esquema de la morfología externa de los embriones del estadio de néurula temprana. En la néurula temprana se observó la presencia de la placa neural que es prominente y está ubicada en la región más rostral del embrión. Se observó la placa neural (Fig. 12B). Se observó al surco neural en la línea media y el blastoporo en la región más caudal del embrión (Fig. 12B). En la sección parasagital con tinción de núcleos (Fig. 12C) se pudo diferenciar el ectodermo superficial y se pudo observar el neuroectodermo como un engrosamiento en la región dorsal anterior del techo del arquenterón (Fig. 12C).

#### 5.2.11. MORFOLOGÍA Y ESTRUCTURA INTERNA DE LA NÉURULA MEDIA (ESTADIO 15) DE *E. guayaco*.

Las figura 13A y 13B son esquemas de la morfología externa de los embriones del estadio de néurula media que señalan los planos de seccionamiento. En este estadio (Fig. 13C) se observó el surco neural, como un canal, debido a la elevación de los pliegues neurales. La figura 13D muestra una sección sagital con tinción de núcleos. Se observó 3-4 somitas aproximadamente. El mesodermo de la cabeza se detectó en la región anterior al primer somita. Se observó el ectodermo como la capa más superficial, el neuroectodermo y una capa de células de endodermo en contacto con el arquenterón. En la sección transversal con luz directa (Fig. 13E) y la misma teñida para tinción de núcleos celulares (Fig. 13F) se observaron a los pliegues neurales elevados a los

costados del notocordio y un par de somitas a los dos lados del notocordio. Se observó que el endodermo se encuentra recubriendo todo el arquenterón.

#### 5.2.12. MORFOLOGÍA Y ESTRUCTURA INTERNA DE LA NÉURULA TARDÍA (ESTADIO 16) DE *E. guayaco*.

Las figuras 14A y 14B son esquemas de la morfología externa de los embriones del estadio de néurula tardía que indican los planos de seccionamiento. En la néurula tardía (Fig. 14C) se observó que los pliegues neurales se han juntado en la línea media del embrión. La figura 14D muestra una sección sagital con tinción de núcleos en la que se pudo observar 4-5 somitas aproximadamente. El notocordio se observó alargado en la región dorsal posterior del embrión. Se observó el ectodermo como la capa más superficial. Además, el mesodermo de la cabeza se detectó en la región anterior al primer somita y el endodermo se encontró recubriendo al arquenterón. En la tinción de núcleos de una sección transversal rostral (Fig. 14E) se observó el tubo neural abierto por encima del notocordio. Se observaron los pliegues neurales y un par de somitas a los costados del notocordio. Se observó la cavidad del intestino (Fig. 14D-E).

#### 5.2.13. MORFOLOGÍA Y ESTRUCTURA INTERNA DEL ESTADIO DE YEMA DE LA COLA (ESTADIO 17) DE *E. guayaco*.

La figura 15A es un esquema de la morfología externa de los embriones del estadio de yema de la cola. En el embrión entero del estadio de la yema de la cola (Fig.

15B) se observó la presencia de la yema de la cola y la forma arqueada de los embriones, que se desarrollan sobre la masa de la yema. En las figuras 15B y 15C se observaron varias estructuras de la cabeza como: las vesículas ópticas, el arco mandibular, arco hioideo, arco branquial anterior, arco branquial posterior y los pronefros. En el embrión entero (Fig.15B) se observaron 8-9 somitas aproximadamente. En la sección sagital (Fig. 15D) y la misma teñida para tinción de núcleos celulares (Fig. 15E) se observaron 8-9 somitas aproximadamente. Además, se observó la vesícula óptica y recubrimiento endodermal del intestino.

#### 5.2.14. MORFOLOGÍA DEL ESTADIO DE RESPUESTA MUSCULAR (ESTADIO 18) DE *E. guayaco*.

La figura 16A es un esquema de la morfología externa de los embriones del estadio de respuesta muscular que señala el plano de seccionamiento. En este estadio los embriones mostraron la respuesta muscular a estímulos mecánicos (Fig. 16B). Se observaron estructuras de la cabeza como: el estomodeo, el arco mandibular, el arco branquial anterior y los pronefros en la zona lateral de la cabeza, en sentido antero-posterior del embrión (Figs. 16B-C). En el embrión entero (Fig.16B) se observaron 9-10 somitas aproximadamente. En una sección teñida para núcleos celulares (Fig. 16D) se observaron 17 somitas aproximadamente. Además, se observó la vesícula óptica y el notocordio alargado en la región dorsal posterior del embrión.

#### 5.2.15. MORFOLOGÍA DEL ESTADIO DE YEMA DE LAS BRANQUIAS (ESTADIO 19) DE *E. guayaco*.

La figura 17A muestra la morfología externa de los embriones del estadio de yema de las branquias. En el embrión entero del estadio de la yema de las branquias (Fig. 17A) se observó la presencia de la yema de las branquias, las cuales sobresalen del arco branquial anterior. Se observó la vesícula óptica y la yema de las branquias a los costados de la cabeza (Fig. 17B). Se observaron 18 somitas aproximadamente. Además, en una vista ventral del embrión se pudo observar el estomodeo (Fig. 17C).

#### 5.2.16. MORFOLOGÍA DEL ESTADIO DE DESARROLLO COMPLETO DE LAS BRANQUIAS (ESTADIO 22) DE *E. guayaco*.

La figura 18A corresponde a un esquema que muestra la disposición y el número de ramificaciones de las branquias de los embriones. En este estadio se observaron las branquias completamente desarrolladas. La rama posterior tiene tres ramificaciones y la rama anterior tiene cinco ramificaciones (Figs. 18A-18B). Se observó circulación de las branquias. Además, se detectó el ojo y la transparencia de la aleta de la cola. En una vista dorsal (Fig. 18C) se observó pigmento en la región dorsal del embrión.



### 5.2.17. MORFOLOGÍA DEL EMBRIÓN A LA ECLOSIÓN (ESTADIO 23) DE *E. guayaco*.

Los embriones de *E. guayaco* iniciaron su vida libre a partir de este estadio. En la figura 19A y 19B se muestra un embrión entero a la eclosión. Se observó el ojo pigmentado, la boca, la transparencia de las aletas y pigmento en la región dorsal del embrión. En una vista ventral del embrión (Fig. 19C) se observó el disco oral y las glándulas de cemento a los costados de la boca. Además, se observó que el opérculo ha cubierto casi en su totalidad a las branquias y el intestino se ha comenzado a enrollar.

### 5.3. EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS MUSCULARES EN LOS ESTADIOS 15.75, 16, 17 Y 18 DE *E. guayaco*.

La expresión de las proteínas de las miofibrillas fue detectada en los somitas de todos los embriones usados para los ensayos de inmunodetección contra proteínas musculares (Figs. 20A - 20D).

La figura 20A corresponde a la néurula media (15.75) de *E. guayaco*, con inmunodetección con el anticuerpo 12/101. En este estadio se observó reacción positiva para las proteínas de las miofibrillas. En la morfología de la néurula tardía (Fig. 13D) se observaron 3-4 somitas. Por inmunodetección con el anticuerpo 12/101 se observaron 4-5 somitas rostrales con reacción positiva para 12/101, teñidos levemente (Fig. 20A).

La figura 20B corresponde a embriones en estadio de yema de la cola de *E. guayaco* (estadio 17), con inmunodetección con el anticuerpo 12/101. Se observó que la

expresión de las proteínas de las miofibrillas marcó los somitas rostrales, se detectaron 7-8 somitas con tinción positiva para 12/101 (Fig. 20B), comparable a lo observado en la morfología de la néurula tardía (Fig. 14D). Se observó que el mesodermo presomítico, en la zona caudal del embrión expresó levemente proteínas de las miofibrillas.

La figura 20C corresponde a embriones en estadio de yema de la cola de *E. guayaco* (estadio 17), con inmunodetección con el anticuerpo 12/101. Se observó que la expresión de las proteínas de las miofibrillas marcó 10 somitas rostrales aproximadamente (Fig. 20C). Se observó un gradiente de concentración en sentido rostro caudal. Los somitas más rostrales presentaron mayor expresión proteica. Además, el mesodermo presomítico expresó proteínas de las miofibrillas en la región caudal del embrión.

La figura 20D corresponde a un embrión en estadio de respuesta muscular de *E. guayaco* (estadio 18), con inmunodetección con el anticuerpo 12/101. Se observó reacción positiva para 15 somitas aproximadamente (Fig. 20D). Se observó que los somitas más rostrales presentan una expresión más marcada que los somitas más caudales.

El mesodermo presomítico de los embriones analizados presentó reacción positiva en menor grado a lo observado en los somitas (Figs. 20A-D). Se observó que conforme avanza el desarrollo, se forman más somitas y más somitas tienen reacción positiva para 12/101.

## 6. DISCUSIÓN

### 6.1 TAMAÑO DE POSTURA, MORFOLOGÍA DEL HUEVO Y TIEMPOS DEL DESARROLLO.

La rana *E. guayaco* y las especies del género *Engystomops*, *E. pustulosus*, *E. randi* y *E. coloradum* comparten características morfológicas en el desarrollo embrionario. El tamaño de postura en las especies de este género es similar e involucran a cientos de huevos por postura (Ryan, 1985; Romero-Carvajal *et al.*, 2009). Esto podría estar relacionado a su estrategia reproductiva, la temperatura y otras condiciones del medio en donde se desarrollan. A pesar de las características del desarrollo embrionario que comparten las especies de este género, presentan diferencias en cuanto al tamaño del huevo y los tiempos del desarrollo.

Entre las distintas especies del género *Engystomops* estudiadas como: *E. randi* y *E. coloradum*, se ha determinado que existe variación en el tamaño de sus huevos (Romero-Carvajal *et al.*, 2009). Los datos obtenidos sobre el diámetro del huevo de *E. guayaco*, ponen en evidencia que esta especie presenta el diámetro del huevo más pequeño reportado entre algunas especies del género *Engystomops* (Tabla 4), en donde se observó que *E. randi* y *E. coloradum* presentan 1.1 y 1.3 mm de diámetro respectivamente (Romero-Carvajal *et al.*, 2009) en comparación con los 0.9 mm de diámetro reportados para *E. guayaco*. El tamaño del huevo no tiene ninguna influencia con los patrones del desarrollo como la velocidad del desarrollo o el modo de gastrulación (del Pino *et al.*, 2007).

La medición de los tiempos del desarrollo de *E. guayaco* fue realizada bajo condiciones de laboratorio, igual a lo realizado para *E. randi* y *E. coloradum*. El tiempo del desarrollo reportado para *E. guayaco* es de 77 horas, aproximadamente 3 días (Tabla 2), comparable con las 72 horas que se reportaron para *E. randi* y *E. coloradum* respectivamente (Tabla 4) (Romero-Carvajal *et al.*, 2009). Por otro lado, el tiempo de gastrulación obtenido para *E. guayaco* fue de 12 horas aproximadamente (Tabla 3), similar a las 12.5 horas reportadas para *E. randi* y *E. coloradum* (Romero-Carvajal *et al.*, 2009). La variación que existe en la tasa del desarrollo puede depender de la variable temperatura (Duellman y Trueb, 1994).

## 6.2 ETAPAS DEL DESARROLLO DE *Engystomops*

En el presente estudio se describe la morfología externa e interna de *E. guayaco* (Anura: Leptodactylidae) desde la fertilización hasta la eclosión de los renacuajos, en un marco comparativo con otras especies del género *Engystomops* y con *X. laevis*. Los estadios de *E. guayaco* se determinaron a partir de la Tabla de *Engystomops* (Romero-Carvajal *et al.*, 2009), y se caracterizaron de acuerdo a lo observado en dicha tabla (Anexo 1).

### 6.2.1 MORFOLOGÍA DEL CLIVAJE Y BLÁSTULA DE *E. guayaco*

El proceso de clivaje en *E. guayaco* es holoblástico y sincrónico. Se observó que los embriones luego de cada división celular, presentan un número par de células. Los

ciclos tempranos de clivaje en los embriones de *E. guayaco* se asemejan a lo reportado para *E. randi* y *E. coloradum*, presentan divisiones celulares síncronas que ocurren cada 25 minutos aproximadamente. Estos tiempos son ligeramente más rápidos en comparación con los 30 minutos reportados para *E. randi* y *E. coloradum*, pero ligeramente más lentos que los 20 minutos que se reporta para *X. laevis* (Romero-Carvajal *et al.*, 2009; Gilbert, 2010).

Los planos de división celular encontrados en *E. guayaco* coinciden con el patrón descrito para especies con huevos pequeños de menos de 2 mm de diámetro como: *X. laevis*, *E. machalilla*, *E. randi* y *E. coloradum* (Niewkoop y Faber, 1994; del Pino *et al.*, 2004; Romero-Carvajal *et al.*, 2009). La formación del primer surco del clivaje permitió identificar la región animal de los embriones de *E. guayaco* cuyo color es uniformemente pálido, similar a lo que ocurre en *E. randi* y *E. coloradum*. La primera división celular se inició en la región animal y avanzó hacia la región vegetal del embrión (Fig. 3B). Antes de que el primer surco del clivaje atravesase por completo al embrión, inició la segunda división celular, que atravesó al embrión de manera perpendicular al primer surco de clivaje (Fig. 3C).

Los embriones de *E. guayaco* en estadio de 32 células presentaron características similares a lo reportado para *E. randi*, *E. coloradum* y *X. laevis* (Niewkoop y Faber, 1994; Romero-Carvajal *et al.*, 2009). Se observó que los blastómeros animales son células más pequeñas que los blastómeros vegetales. En las tres especies del género *Engystomops* se observaron células de menor tamaño debido a las continuas divisiones celulares que están ocurriendo en el embrión (Romero-Carvajal *et al.*, 2009). En los embriones de *X. laevis* y en *Engystomops*, la diferencia de tamaño entre los blastómeros animales y vegetales, ocurre debido a que en la región vegetal existe acumulación de yema (Wolpert *et al.*, 2007). En la vista interna de este estadio, se observó una pequeña

cavidad, el blastocele. Esta cavidad se encuentra desplazada hacia la región animal del embrión (Fig. 4D).

En los estadios de blástula de *E. guayaco*, aún se puede apreciar la diferencia de tamaño entre las células de la región animal y vegetal (Figs. 5B y 6B). En los embriones de blástula de células grandes de *E. guayaco* (Fig. 5C), se observó que el blastocele es pequeño, similar a lo observado en *E. coloradum* (Anexo 2D) (Romero-Carvajal *et al.*, 2009). Por otro lado, durante el estadio de blástula de células medianas de *E. guayaco* (Fig. 6C), se observó que el blastocele presenta un tamaño mediano, ligeramente más pequeño que lo observado en *E. coloradum* (Anexo 2E) (Romero-Carvajal *et al.*, 2009).

#### 6.2.2 MORFOLOGÍA DE LA GÁSTRULA Y MODO DE GASTRULACIÓN EN *E. guayaco*

La primera señal visible del inicio de la gastrulación es la formación del labio dorsal del blastoporo (Gilbert, 2010) (Anexo 3A). En *E. guayaco* la formación del labio dorsal del blastoporo se inició en el estadio de gástrula temprana (estadio 10), esta estructura se observó externamente en la región subecuatorial del embrión (Fig. 7B). Además, se pudo observar la presencia de células de botella en la hendidura del blastoporo en un estadio de gástrula temprana (estadio 10) (Fig. 7E). Las características morfológicas de la gástrula temprana observadas en *E. guayaco*, muestran que la formación del labio dorsal del blastoporo se forma igual a lo reportado en *E. randi* y *E. coloradum*, en la región subecuatorial (Romero-Carvajal *et al.*, 2009). Las células de botella en *E. randi* fueron reportadas en un estadio ligeramente más avanzado de la

gástrula (estadio 10.5) (Anexo 2F-G) (Romero-Carvajal *et al.*, 2009). El cambio en la forma de las células está involucrado con el inicio de los movimientos morfogenéticos de la gastrulación (Anexo 3B) (Keller *et al.*, 2003).

Durante la involución de las células en la gastrulación de *X. laevis*, las células vegetales ingresan al interior del embrión (Wolpert *et al.*, 2007). En el lado dorsal de la gástrula media de *E. guayaco* se observó la presencia de un surco que separa las células superficiales de células vegetales internas (Fig. 8D), el cleft de Brachet. Este surco también se encuentra presente en *E. randi* y *E. coloradum* (Anexo 2K) (Romero-Carvajal *et al.*, 2009), se encarga de separar las capas celulares que ingresan al embrión por involución (endomesodermo), de la capa de células que no involucionan (ectodermo) (revisado por Ibrahim y Winklbauer, 2001). Esto está relacionado con la diferenciación del endodermo y mesodermo en el embrión (revisado por Ibrahim y Winklbauer, 2001).

El número de las capas de células que conforman el techo del blastocele se reduce conforme se agranda el blastocele y ocurre el proceso de epíbole (Gilbert, 2010). En *X. laevis*, el movimiento de epíbole es generado por la intercalación radial de las células del techo, lo que reduce el número de células y amplía la superficie de la capa celular que no involuciona (Anexo 3C) (revisado por Keller y Shook, 2004). El grosor del techo del blastocele de *E. guayaco* se reduce, de 5-6 capas de células en la gástrula temprana a 2 capas de células en la gástrula tardía (Fig. 9D). En comparación *E. randi* y *E. coloradum* reducen el número de capas celulares de 3 capas de células en gástrula media a 2 capas de células en gástrula tardía (Romero-Carvajal *et al.*, 2009). En función a lo observado en las tres especies del género *Engystomops*, la reducción del número de capas celulares de los embriones en estadio de gástrula, podría estar relacionado con la intercalación entre células ectodermas profundas y superficiales, para el recubrimiento

ectodermal de todo el embrión. Se deben realizar estudios para determinar si este tipo de intercalación celular ocurre en estas especies (revisado por Keller *et al.*, 2003).

Durante el proceso de gastrulación de *E. guayaco* ocurre la formación del arquenterón (futuro intestino). Durante los estadios de gástrula de *X. laevis*, la inflación y elongación del arquenterón son procesos que ocurren independientemente el uno del otro (Ewald *et al.*, 2004). Se observó que estos procesos ocurren simultáneamente en los embriones de *E. guayaco*, *E. randi* y *E. coloradum* (Romero-Carvajal *et al.*, 2009). La inflación del arquenterón, posiblemente, está relacionada con el influjo de líquido proveniente del blastocele.

En secciones transversales de gástrula tardía y post-gástrula de los embriones de *E. guayaco*, se observó la presencia de notocordio (Figs. 10C, 10D y 11E), como un paquete central de células que se diferencia del mesodermo paraxial, a ambos lados. Se recomienda realizar estudios sobre la expresión de la proteína *brachyury*, para demostrar que ocurre extensión convergente al mismo tiempo que se elonga el notocordio en *E. guayaco* (Gilbert, 2010).

El alargamiento del arquenterón a partir de la gástrula temprana y la presencia de notocordio durante la gástrula tardía en *E. guayaco*, sugieren que esta especie comparte el mismo patrón de gastrulación con las especies de desarrollo rápido *X. laevis*, *E. randi* y *E. coloradum* (Romero-Carvajal *et al.*, 2009). En este patrón la elongación del arquenterón inicia en la gástrula temprana (estadio 10) mientras que el alargamiento del notocordio inicia en la gástrula media (estadio 11) (Anexo 4) (revisado por del Pino *et al.*, 2007).



A diferencia de lo observado en otros *Engystomops*, el cerramiento del blastoporo en *E. guayaco* ocurrió en el estadio de post-gástrula (Fig. 11C y 11D). Los embriones en este estadio no se observaron con tapón de yema.

### 6.2.3 NEURULACIÓN EN *E. guayaco* (ESTADIOS 14-16)

El proceso de neurulación es el encargado de la formación del tubo neural, precursor del sistema nervioso (Gilbert, 2010). En las especies con desarrollo rápido como los *Engystomops* y *X. laevis*, la neurulación inicia antes de que finalice el proceso de gastrulación (Romero-Carvajal *et al.*, 2009). En *E. randi*, *E. coloradum* y *X. laevis* la formación de la placa neural es el primer signo visible que marca el inicio de la neurulación (Anexo 5A) (Niewkoop y Faber, 1994; Romero-Carvajal *et al.*, 2009). La placa neural se detectó en la post-gástrula (estadio 13) en los embriones de *E. guayaco* como una estructura en forma de herradura ubicada en la región más rostral del embrión (Fig. 11E), en contraste a lo observado para *E. randi*, *E. coloradum* y *X. laevis*, en donde la placa neural fue observada en los embriones en post-gástrula avanzada y néurula temprana (estadio 14) (Niewkoop y Faber, 1994; Romero-Carvajal *et al.*, 2009). Esta diferencia podría estar relacionada con un pequeño aumento en la velocidad del desarrollo de *E. guayaco*, aunque se requerirían más estudios que justifiquen esta hipótesis.

El estadio de néurula media (estadio 15) se caracteriza por la elevación de los pliegues neurales en los bordes de la placa neural (Anexo 5B) (Gilbert, 2010). En los embriones de *E. randi* y *E. coloradum* los pliegues neurales son más pronunciados que en *X. laevis* (Romero-Carvajal *et al.*, 2009), mientras que en *E. guayaco* se observó

a los pliegues neurales aún más prominentes que en las especies mencionadas (Fig. 13E-F). Durante los estadios de néurula tardía (estadio 16) no se observaron diferencias morfológicas entre *E. randi*, *E. coloradum* y *E. guayaco*, todas ellas se asemejan a lo descrito para *X. laevis*, en donde los pliegues neurales se fusionan en la línea media del embrión y el tubo neural se cierra (Anexo 5C-D) (Gilbert, 2010).

A partir del estadio de néurula temprana (estadio 14) de *E. randi* y *E. coloradum* se observó la presencia de un par de somitas (Romero-Carvajal *et al.*, 2009), a diferencia de lo observado en *E. guayaco*, quien no reporta la presencia de somitas en estadio de néurula temprana (estadio 14) (Fig. 12C). El desarrollo temprano de somitas en *Engystomops* podría estar relacionado con el desarrollo rápido y los requerimientos de los embriones para desarrollar músculo, que les sirva para su posterior vida en el agua. Al finalizar el proceso de neurulación se observó que *E. guayaco* tiene aproximadamente 4-5 somitas a lo largo del eje antero-posterior del embrión (Fig. 14D), similar a lo reportado para *E. coloradum* (Romero-Carvajal *et al.*, 2009).

Las especies con desarrollo rápido como los *Engystomops* y *X. laevis*, la neurulación inicia antes de que finalice el proceso de gastrulación (Romero-Carvajal *et al.*, 2009). Las similitudes encontradas en el desarrollo neural entre las especies del género *Engystomops*, resultan debido a que los mecanismos de neurulación entre los anuros son similares y altamente conservados (Pourquié, 2003; Romero-Carvajal *et al.*, 2009).

#### 6.2.4 MORFOLOGÍA DE LA YEMA DE LA COLA Y EMBRIONES AVANZADOS (17-23)

En el estadio de yema de la cola (estadio 17) y en estadios avanzados del desarrollo, los embriones de *E. guayaco* se desarrollan sobre una masa endodermal de yema (Figs. 15B y 15C). Esta característica está presente de igual forma en los embriones de *E. randi* y *E. coloradum* (Romero-Carvajal *et al.*, 2009). Externamente en los embriones tanto de *E. guayaco* como de *E. randi*, *E. coloradum* y *X. laevis*, se puede observar la presencia de somitas y pronefros a los dos lados de la zona lateral de la cabeza (Fig. 15C). Los pronefros son una estructura derivada del mesodermo y son precursores de los riñones (Gilbert, 2010).

En el estadio completo del desarrollo de las branquias (estadio 22) de *E. guayaco*, se observó que la rama posterior presenta 3 ramificaciones y la rama anterior 5 ramificaciones (Figs. 18A-18B). Esta característica es específica para cada especie, por lo tanto para *E. randi* se reportaron 4 ramificaciones en la rama posterior y 6 ramificaciones en la rama anterior, mientras que para *E. coloradum* se observaron 5 ramificaciones en la rama posterior y 6 en la rama anterior (Romero-Carvajal *et al.*, 2009).

Las ranas del género *Engystomops* presentan branquias pequeñas, con pocas ramificaciones (Romero-Carvajal *et al.*, 2009), lo que podría estar asociado a su estrategia reproductiva. Aparentemente, se podría especular que la formación del nido de espuma encapsula moléculas de oxígeno en burbujas que son ocupadas dependiendo del requerimiento de oxígeno que tengan los embriones (Dalgetty y Kennedy, 2010). Por esta razón, se cree que en estas especies la longitud de las branquias es corta y no

desarrollan muchas ramificaciones, en comparación con las ranas dendrobátidas que presentan branquias largas y con varias ramificaciones (del Pino *et al.*, 2004).

Los renacuajos desarrollan características que les permitirá seguir con un desarrollo larval acuático. En los embriones en estadio de desarrollo completo de las branquias (estadio 22) de *E. guayaco* se pudo observar la aleta de la cola, el ojo completamente desarrollado y ubicado en la región más rostral del embrión y la boca. Se observaron glándulas de cemento en el estadio a la eclosión de *E. guayaco*, estas son estructuras que les permite adherirse a sustratos (Figs. 18-19). Las glándulas de cemento han sido observadas en otras especies del género *Engystomops* (Romero-Carvajal *et al.*, 2009). En el estadio a la eclosión, los embriones de *E. guayaco* junto con *E. randi* y *E. coloradorum* presentan pigmento en la región dorsal del cuerpo (Romero-Carvajal *et al.*, 2009), característica que podría estar relacionada con el camuflaje que requieren para su etapa larval.

### **6.3 PIGMENTACIÓN EN LOS EMBRIONES DE *Engystomops***

La presencia de pigmento en estadios tempranos en anuros representa una adaptación de protección contra los rayos UV de sol (Lee *et al.*, 2009). Los huevos de *X. laevis* presentan coloración marrón en el hemisferio animal, mientras que el hemisferio vegetal no presenta pigmentación, es blanco o de color crema (Lee *et al.*, 2009). La distribución de los gránulos de pigmento ocurre tempranamente en la oogénesis y la blástula temprana de *X. laevis* y depende de la expresión proteica de *shroom2* y de espectrina (Lee *et al.*, 2009). Se ha encontrado que todas las especies del género *Engystomops*, presentan huevos blancos (despigmentados) o ligeramente pigmentados

(Dalgetty y Kennedy, 2010). Esta característica, les permite camuflarse perfectamente en el nido de espuma flotante que es blanco. Se ha encontrado que los niveles del ARNm de *shroom2* en los huevos y en la blástula de *Engystomops* son muy bajos, comparado con los altos niveles observados en *X. laevis* (Lee *et al.*, 2009). En los embriones tempranos de *X. laevis*, la sobreexpresión de *shroom2* incrementa la expresión de espectrina, acumulándose en la corteza, induciendo la pigmentación de las células epiteliales (Lee *et al.*, 2009).

La presencia de pigmento en los embriones en estadios de blástula que se ha encontrado en *X. laevis*, se asemeja a lo reportado para algunas especies del género *Engystomops* (Lee *et al.*, 2009). Los embriones de *E. guayaco* se caracterizan por la ausencia de pigmento durante el desarrollo en el nido de espuma. Sin embargo, se observó pigmentación de color marrón alrededor de los núcleos (Elinson y del Pino, 2012). En *E. guayaco*, la presencia de pigmento alrededor de los núcleos en embriones enteros y en secciones se observó a partir del estadio de blástula de células grandes (estadio 7) (Fig. 5B) y se mantuvo hasta un estadio de blástula de células medianas (estadio 8) (Fig. 6B). A pesar que la presencia de pigmento no fue muy marcada en todos los estadios de blástula de *E. guayaco*, este aspecto fue comparable con lo observado en otras especies del género *Engystomops* y *X. laevis*. Los resultados muestran que en los estadios de blástula de *E. guayaco* (Fig. 5B-D y 6B-D) el pigmento es tenue, mientras que en *E. coloradum* (Fig. 5D y 6D) y *E. pustulosus* el pigmento es intenso. Inclusive, en la blástula de los embriones de *X. laevis* el pigmento es aún más intenso en las células epiteliales en comparación con *Engystomops* (Anexo 6).

La carencia de pigmentación observada en los huevos de *E. guayaco*, *E. coloradum* y *E. pustulosus*, está relacionada con los niveles bajos de ARNm de *shroom2* reportados para *Engystomops* (Lee *et al.*, 2009). Por otro lado, se sugiere que

la expresión *shroom2* en *Engystomops* estaría retrasada hasta estadios de blástula temprana, en donde se reporta inicialmente pigmento en los embriones de este género (Romero-Carvajal *et al.*, 2009), mientras que en *X. laevis* la expresión de *shroom2* inicia desde la oogénesis (Lee *et al.*, 2009). Por último, se creería que en *E. guayaco* la expresión de *shroom2* durante la blástula temprana estaría retrasada ligeramente. Esto es debido a la leve pigmentación observada en esta especie en comparación a lo observado en *E. coloradum*, aunque se requieren de estudios de la expresión de *shroom2* para ambas especies que ayuden a confirmar esta hipótesis.

#### **6.4 EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS MUSCULARES EN *E. guayaco*.**

En el presente estudio se analizó la expresión de proteínas musculares en los embriones de *E. guayaco*. Para el análisis se realizaron inmunodetecciones con el anticuerpo monoclonal 12/101.

El patrón de la expresión de proteínas musculares observado en *X. laevis*, muestra que la traducción del ARNm de los genes musculares inicia en la gástrula tardía, al igual que la síntesis muscular de alfa-actina y los transcriptos de cadena pesada de miosina para la especificación muscular (Radice *et al.*, 1989).

Al comparar el patrón de expresión de las proteínas en ranas del género *Engystomops*, se han detectado variaciones en el inicio de la expresión de proteínas musculares. Se observó en las ranas *E. randi* y *E. coloradum* que el análisis de la expresión de proteínas musculares inicia a partir del estadio de neurula tardía (Romero-Carvajal *et al.*, 2009). En contraste, en *E. guayaco* se observó la expresión proteica más temprana de las miofibrillas de actina a partir de estadio de neurula media (estadio

15.75). En este estadio se evidenció tinción positiva leve para los somitas más rostrales (Fig. 20A). Las diferencias observadas pueden estar relacionadas a la especificidad que tiene los anticuerpos. Para las ranas *E. randi* y *E. coloradum*, se utilizó el anticuerpo monoclonal MF20 (Romero-Carvajal *et al.*, 2009). Este anticuerpo reconoce Meromiosina ligera y miosina de cadena pesada (Bader *et al.*, 1982), mientras que en *E. guayaco* la expresión de proteínas musculares fue realizada con el anticuerpo monoclonal 12/101. El anticuerpo 12/101 es específico y reconoce las miofibrillas del músculo esquelético en anfibios (Kintner y Brockes, 1984).

El patrón de gastrulación podría estar relacionado con diferencias en los tiempos de la expresión de proteínas musculares. Los movimientos de convergencia y extensión dorsales están relacionados con la distribución futura de las fibras musculares, debido a que determinan la especificación de los tejidos mesodermales (Krneta-Stankic *et al.*, 2010). La convergencia y extensión dorsales en *X. laevis*, *E. randi* y *E. coloradum*, ocurre de manera temprana durante la gastrulación (del Pino *et al.*, 2007; Romero-Carvajal *et al.*, 2009) y se creería que la convergencia y extensión dorsales también ocurre de manera temprana durante la gastrulación de los embriones de *E. guayaco*, aunque se requieren de estudios con marcadores moleculares que confirmen esta hipótesis.

Por otro lado, el alargamiento del notocordio también podría estar relacionado con la variación en los tiempos de expresión de proteínas musculares, debido a que las señales provenientes del notocordio y del tubo neural mantienen la expresión de proteínas en el miotoma (Christ y Brand-Saberi, 2002). En las ranas con desarrollo rápido, el alargamiento del notocordio ocurre simultáneamente con la gastrulación. Por este motivo, se observó que el inicio de la expresión de proteínas musculares en *Engystomops* ocurrió durante la neurulación. A diferencia de las ranas con desarrollo

lento, como los dendrobátidos, el alargamiento del notocordio ocurre después de la gastrulación (del Pino *et al.*, 2007). En la rana dendrobátida *E. machalilla*, la expresión de proteínas musculares es detectada a partir del estadio de yema de la cola (del Pino *et al.*, 2007).

Es posible que en las ranas del género *Engystomops*, la especificación muscular en los somitas tarde menos tiempo que en los dendrobátidos, debido a las diferencias en la velocidad de desarrollo que presenta cada especie.

## **6.5 IMPORTANCIA DEL ESTUDIO DEL DESARROLLO TEMPRANO DE *E. guayaco***

Los resultados del estudio de la morfología de los embriones de *E. guayaco*, permitieron revelar la variación y semejanzas en los eventos del desarrollo temprano de esta especie. Las características que presenta *E. guayaco* a lo largo de todo su desarrollo embrionario, se asemejan al patrón de desarrollo temprano reportado para *E. randi* y *E. coloradum* (Romero-Carvajal *et al.*, 2009), especies que se encuentran filogenéticamente muy cercanas entre sí (Ron *et al.*, 2006).

Este estudio, refuerza la idea de que la estrategia reproductiva es la fuerza que establece el tiempo de gastrulación y no el tamaño del huevo (del Pino *et al.*, 2007). El patrón de gastrulación observado en *E. guayaco*, involucra características morfológicas como: el inicio de la elongación del arquenterón en la gástrula temprana y el inicio del alargamiento del cuerpo en la gástrula media, sugiriendo que el modo de gastrulación de estas especies coincide con el modo de gastrulación reportado para *E. coloradum*, *E. randi* y *X. laevis*, caracterizándolas como especies de desarrollo rápido (del Pino *et al.*,



2007). Por otro lado, se sugiere la realización de análisis moleculares que brinden un soporte extra a lo observado morfológicamente.

El análisis del desarrollo embrionario temprano de *E. guayaco*, incrementa el conocimiento sobre este tema en anuros ecuatorianos. De esta forma, el presente estudio contribuye con el conocimiento del desarrollo embrionario y la biología de esta especie, utilizándola como una herramienta para futuros estudios comparativos que se realicen en el Laboratorio de Biología del Desarrollo de la PUCE.

## 7. LITERATURA CITADA

Bauer, D. V., Huang, S. y Moody, S.A. 1994. The cleavage stage origin of Spemann's Organizer: analysis of the movements of blastomere clones before and during gastrulation in *Xenopus*. *Development*. 120: 1179-1189.

Bader, D., Masaki, T. y Fischman, D.A. 1982. Immunochemical analysis of myosin heavy chain during avian myogenesis *in vivo* and *in vitro*. *Journal Cell Biology*. 95(3):763-70.

Benítez, M.S. y del Pino, E.M. 2002. The expression of *brachyury* during development of the dendrobatid frog *Colostethus machalilla*. *Developmental Dynamics*. 225: 592–596.

Browder L. e Iten L. 1998. *Xenopus* as a Model System in Developmental Biology. an Online reference]. (March 4, 1998) Dynamic Development. <<http://people.ucalgary.ca/~browder/frogsrus.html>> [Consulta: 9 Marzo, 2014].

Cooper, A., Kennedy, M. W., Fleming, R. I., Wilson, E. H., Videler, H., Wokosin, D. L., Su, T., Green, R. J. y Lu, J. R. 2005. Adsorption of frog foam nest proteins at the air-water interface. *Biophysical Journal*. 88: 2114-2125.

Christ, B. y Brand-Saberi, B. 2002, Limb muscle development. *Developmental Biology*. 46: 905-914.

Dalgetty, L. y Kennedy, M. W. 2010. Building a home from foam túngara frog foam nest architecture and three-phase construction process. *Biology Letters*, 6(3), 293–6.

del Pino, E. M. y Escobar, B. 1981. Embryonic stages of *Gastrotheca riobambae* (Fowler) during maternal incubation and comparison of development with that of other egg-brooding hylid frogs. *Journal of morphology*. 167: 277–95.

del Pino, E. M. 1996. The Expression of *Brachyury* (T) during gastrulation in the marsupial frog *Gastrotheca riobambae*. *Developmental Biology*. 177: 64–72.

del Pino, E.M., Ávila, M. E., Pérez, O. D., Benítez, M. S., Alarcón, I., Noboa, V. y Moya, I. 2004. Development of the dendrobatid frog *Colostethus machalilla*. *International Journal of Developmental Biology*. 48: 663-670.

del Pino, E. M., Venegas-Ferrin, M., Romero-Carvajal, A., Montenegro-Larrea, P., Saenz Ponce, N., Moya, I. M., Alarcón, I., Sudou, N., Yamamoto, S. y Taira, M. 2007. A comparative analysis of frog early development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 104: 11882–11888.

Duellman, W. y Trueb, L. 1986. *Biology of Amphibians: Reproductive strategies*. McGraw Hill Book Company. New York.

Duellman, W. y Trueb, L. 1994. *Biology of Amphibians*. The John Hopkins University Press. Baltimore, USA.

Elinson, R. P. y del Pino, E. M. 2012. Developmental Diversity of Amphibians. *Wiley interdisciplinary reviews. Developmental biology*. 1: 345–369.

Ewald, A.J., Peyrot, S.M., Tyszka, J.M., Fraser, S.E. y Wallingford, J.B. 2004. Regional requirements for Dishevelled signaling during *Xenopus* gastrulation: separable effects on blastopore closure, mesendoderm internalization and archenteron formation. *Development* 131: 6195-6209.

Gilbert, S. F. 2010. Developmental Biology. Séptima Edición. Sinauer associates, Inc. USA.

Heasman, J. 2006. Patterning the early *Xenopus* embryo. Development. 133: 1205-1217.

Höld, W. 1990. An analysis of foam nest construction in the Neotropical frog *Physalaemus ephippifer* (Leptodactylidae). Copeia. 2: 547 – 554.

Ibrahim, H. y Winklbauer, R. 2001. Mechanisms of mesendoderm internalization in the *Xenopus* gastrula: lessons from the ventral side. Dev. Biol. 240: 108–122.

Keller, R. Davidson, L. A. y Shook, D. R. 2003. How we are shaped : The biomechanics of gastrulation. Differentiation; Research in Biological Diversity. 71: 171–205.

Keller, R. y Shook, D. R. 2004. Gastrulation in Amphibians. En: Gastrulation: From Cells to Embryo. Cell. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York. E.E. U.U.

Kintner, C.R. y Brockes, J.P. 1984. Monoclonal antibodies identify blastemal cells derived from dedifferentiating limb regeneration. Nature. 308 (5954): 67-9.

Krneta-Stankic, V., Sabillo, A. y Domingo, C.R. 2010. Temporal and spatial patterning of axial myotome fibers in *Xenopus laevis*. Developmental Dynamics 239: 1162-1177.

Lee, C., Le, M.-P., Cannatella, D. y Wallingford, J. B. 2009. Changes in localization and expression levels of Shroom2 and spectrin contribute to variation in amphibian egg pigmentation patterns. Development Genes and Evolution, 219(6), 319–30.

- Mackenzie, C. D., Smith, B. O., Meister, A., Blume, A., Zhao, X., Lu, J. R. y Cooper, A. 2009. Ranaspumin-2: structure and function of a surfactant protein from the foam nests of a tropical frog. *Biophysical Journal*, 96(12), 4984–92.
- Moya, I. M., Alarcón, I. y del Pino, E. M. 2007. Gastrulation of *Gastrotheca riobambae* in comparison with other frogs. *Developmental Biology*. 304: 467-478.
- Niewkoop, P. D. y Faber, J. 1994. Normal table of *Xenopus laevis* (Daudin). Garland Publishing. London.
- Pourquié, O. 2003. Vertebrate somitogenesis: a novel paradigm for animal segmentation?. *International Journal of Developmental Biology*. 47: 597-603.
- Radice, G. P., Neff, A. W., Yhong, H. S., Brustis, J. J. y Malacinski, G. M. 1989. Developmental histories in amphibian myogenesis. *International Journal of Developmental Biology*. 33: 325 – 343.
- Romero-Carvajal, A., Sáenz-Ponce, N., Venegas-Ferrín, M., Almeida-Reinoso, D., Lee, C., Bond, J., Ryan M. J., Wallingford J. B. y del Pino, E. M. 2009. Embryogenesis and laboratory maintenance of the foam-nesting túngara frogs, genus *Engystomops* (= *Physalaemus*). *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists*. 238: 1444–54.
- Ron, S. R., Cannatella, D. C. y Coloma, L. A. 2004. Two New Species of *Physalaemus* (Anura: Leptodactylidae) From Western Ecuador. *Herpetológica*. 60: 261–275.
- Ron, S. R., Santos, J. C. y Cannatella, D. C. 2006. Phylogeny of the túngara frog genus *Engystomops* (*Physalaemus pustulosus* species group; Anura: Leptodactylidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 39: 392-403.

Ryan, M. J. 1985. The tungara frog: A study in sexual selection and communication. University of Chicago Press.

Salazar-Ciudad, I., Jernvall, J. y Newman, S. A. 2003. Mechanisms of pattern formation in development and evolution. *Development*. 130: 2027-2037.

Salazar-Nicholls, M-J. y del Pino, E. M. 2015. Early development of the glass frogs *Hyalinobatrachium fleischmanni* and *Espadarana callistomma* (Anura: Centrolenidae) from cleavage to tadpole hatching. *Amphibian & Reptile Conservation*. 8(1) [Special Section]: 89–106 (e88).

Shook, D. R., Majer, C. y Keller, R. 2004. Pattern and morphogenesis of presumptive superficial mesoderm in two closely related species, *Xenopus laevis* and *Xenopus tropicalis*. *Developmental Biology*. 270: 163– 185.

Smith, J. C., Cunliffe, V., O'Reilly, M. J., Schulte-Merker, S. y Umbhauer, M. 1995. *Xenopus Brachyury*. *Seminars in Developmental Biology*. 6: 405–410.

Smith, J. C., Price, B. M., Green, J. B., Weigel, D. y Herrmann, B. G. 1991. Expression of a *Xenopus* homolog of *Brachyury (T)* is an immediate-early response to mesoderm induction. *Cell*. 67: 79-87.

Stuart, S. 2010. *Engystomops guayaco*. In: IUCN 2013. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2013.2. <[www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org)>. Consultado el 03 April 2014.

Tada, M. y Smith, J. C. 2001. T-targets: Clues to understanding the functions of T-box proteins. *Development*. 43: 1–11.

Venegas-Ferrin, M., Sudou, N., Taira, M. y del Pino, E. M. 2010. Comparison of *Lim1* expression in embryos of frogs with different modes of reproduction. The International journal of developmental biology. 54: 195–20

Wake, M. H. 2003. Reproductive modes, ontogenies, and the evolution of body form. Animal Biology. 53: 209 – 223.

Wells, K. 2007. The Ecology and Behavior of Amphibians. The University of Chicago Press, Chicago.

Wolpert, L., Beddington R., Brockes J., Jessell T., Lawrence P. y Meyerowitz E. 2007. Principles of Development. London, New York: Current Biology Ltd. Oxford University Press.

## **8. FIGURAS**



## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>A:</b> Hemisferio animal	<b>ld:</b> Labio dorsal del blastoporo
<b>a:</b> Arquenterón	<b>lv:</b> Labio ventral del blastoporo
<b>aba:</b> Arco branquial anterior	<b>mc:</b> Mesodermo de la cabeza
<b>abp:</b> Arco branquial posterior	<b>mp:</b> Mesodermo paraxial
<b>ac:</b> Aleta de la cola	<b>n:</b> Notocordio
<b>ah:</b> Arco hioideo	<b>ne:</b> Neuroectodermo
<b>am:</b> Arco mandibular	<b>o:</b> Ojo
<b>b:</b> Blastocelo	<b>op:</b> Opérculo
<b>b:</b> Boca	<b>pf:</b> Pronefros
<b>bp:</b> Blastoporo	<b>p:</b> Pliegues neurales
<b>br:</b> Branquias	<b>pn:</b> Placa neural
<b>c:</b> Clivaje	<b>ra:</b> Rama anterior de las branquias
<b>do:</b> Disco oral	<b>rp:</b> Rama posterior de las branquias
<b>e:</b> Ectodermo	<b>s:</b> Somitas
<b>em:</b> Endomesodermo	<b>sn:</b> Surco neural
<b>en:</b> Endodermo	<b>so:</b> Estomodeo
<b>gc:</b> Glándulas de cemento	<b>tn:</b> Tubo neural
<b>i:</b> Intestino	<b>ty:</b> Tapón de yema

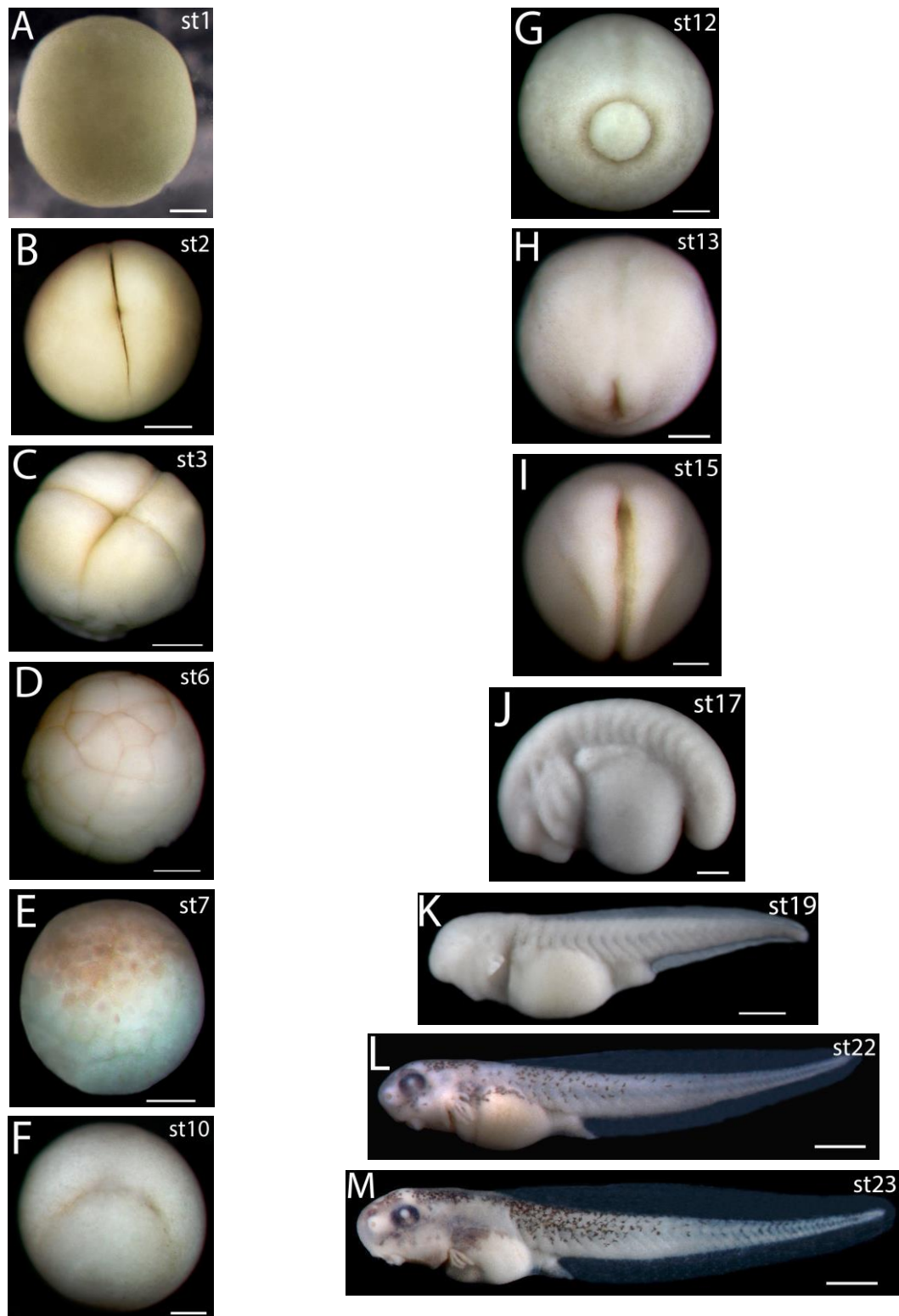
**y:** Yema

**yb:** Yema de las branquias

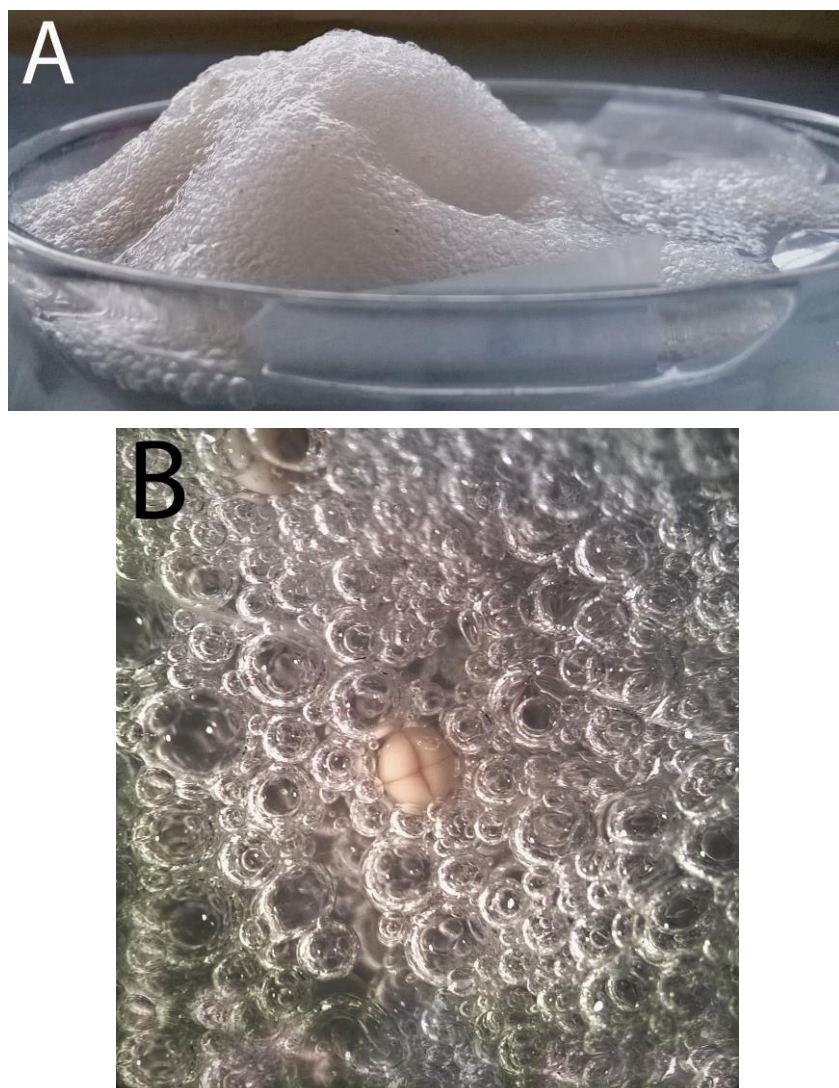
**yc:** Yema de la cola

**v:** Hemisferio vegetal

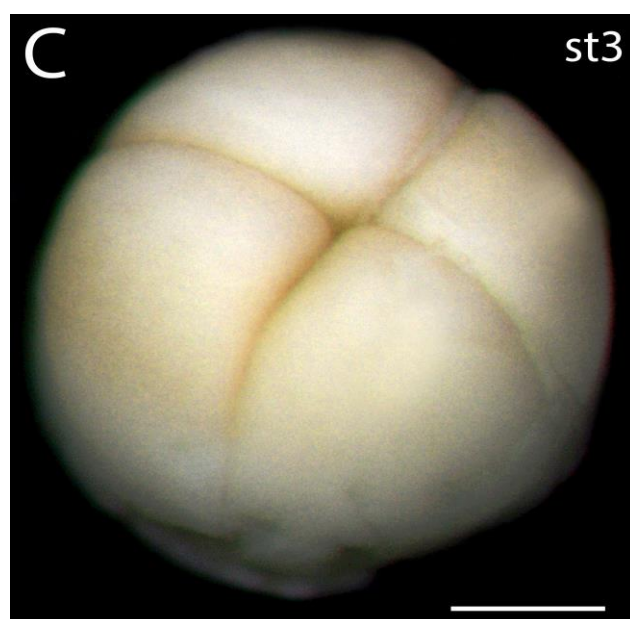
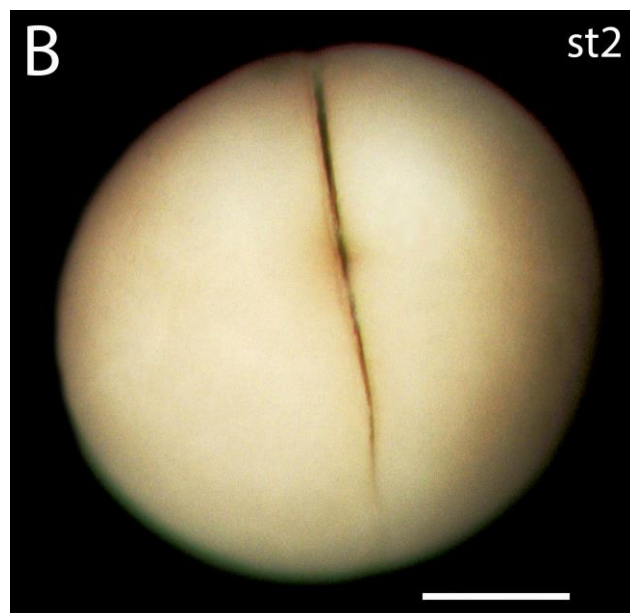
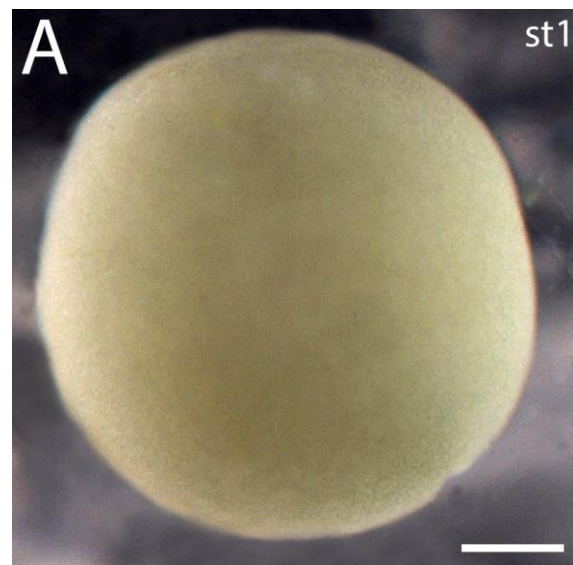
**vo:** Vesícula óptica

**Fig. 1.**

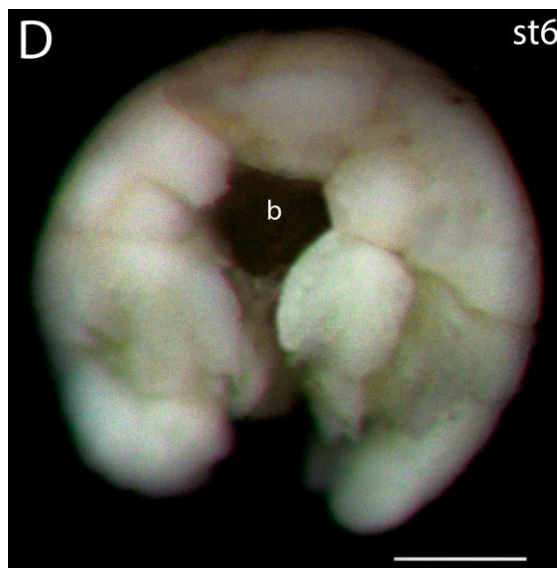
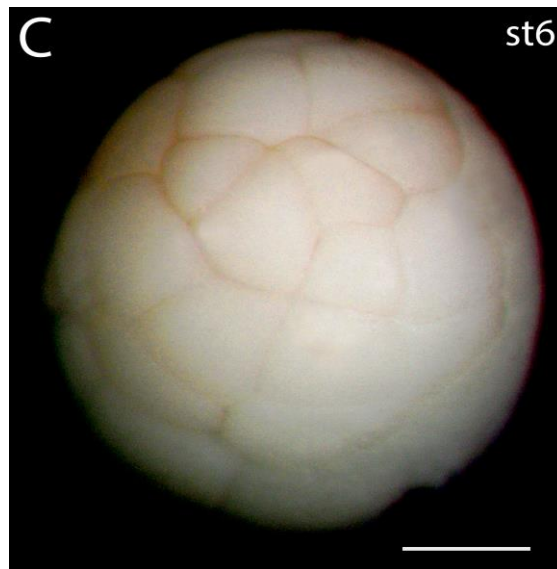
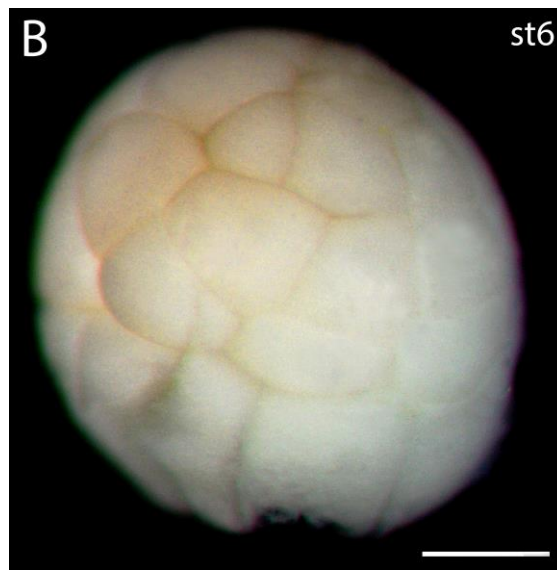
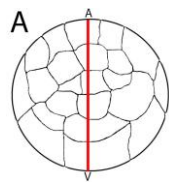
**Figura 1. Resumen del desarrollo temprano de *E. guayaco*.** Las imágenes A-M resumen el desarrollo de *E. guayaco*, usando estadios representativos. A, B, E, J, K, L y M son vistas laterales. C y D son vistas animales. F y G son vistas posteriores. H e I son vistas dorsales. (A) Huevo fertilizado. (B) Embrión estadio de 2 células. (C) Embrión estadio de 4 células. (D) Embrión estadio de 32 células. (E) Blástula de células grandes. (F) Gástrula temprana. (G) Gástrula tardía. (H) Post-gástrula. (I) Néurula media. (J) Estadio de yema de la cola. (K) Estadio de yema de las branquias. (L) Estadio de desarrollo completo de las branquias. (M) Estadio a la eclosión. Las barras en B, C, D, E, K, L y M corresponden a 500  $\mu\text{m}$  y en A, F, G, H, I y J corresponden a 200  $\mu\text{m}$ .

**Fig. 2.**

**Figura 2. Postura de *E. guayaco*:** (A) Nido flotante de espuma. (B) Aumento del nido flotante de espuma mostrado en A. Nótese el embrión en estadio de 4 células que se encuentra resguardado dentro del nido flotante de espuma.

**Fig. 3.**

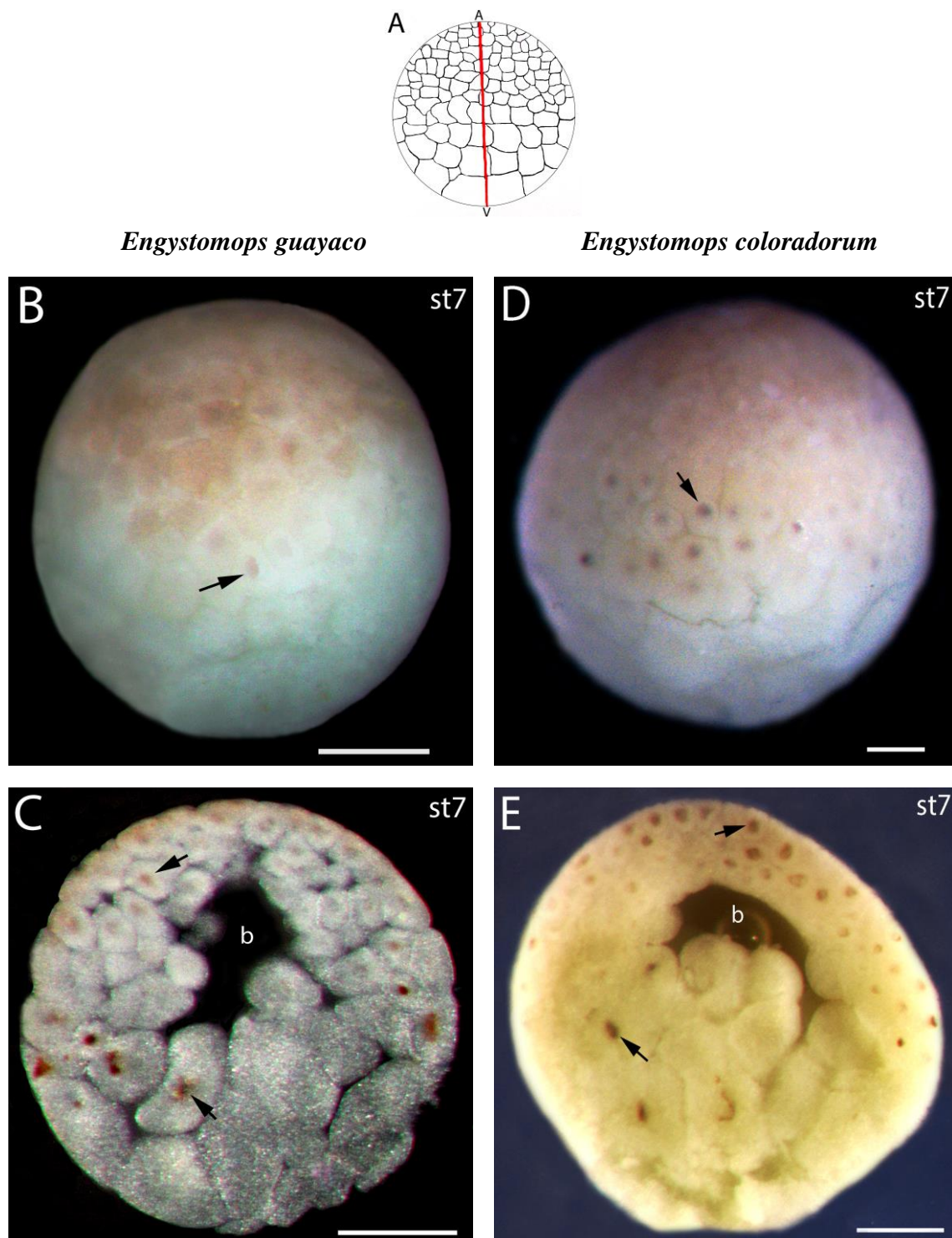
**Figura 3. Morfología del clivaje de *E. guayaco* (estadios 1, 2 y 3):** (A) Huevo fertilizado. Vista externa. Diámetro del huevo 0.9 mm. (B) Embrión en el estadio de 2 células. Vista externa. (C) Embrión en el estadio de 4 células. Vista externa. La barra en C corresponde a 200  $\mu\text{m}$  y las barras en D y E corresponden a 500  $\mu\text{m}$ .

**Fig. 4.**



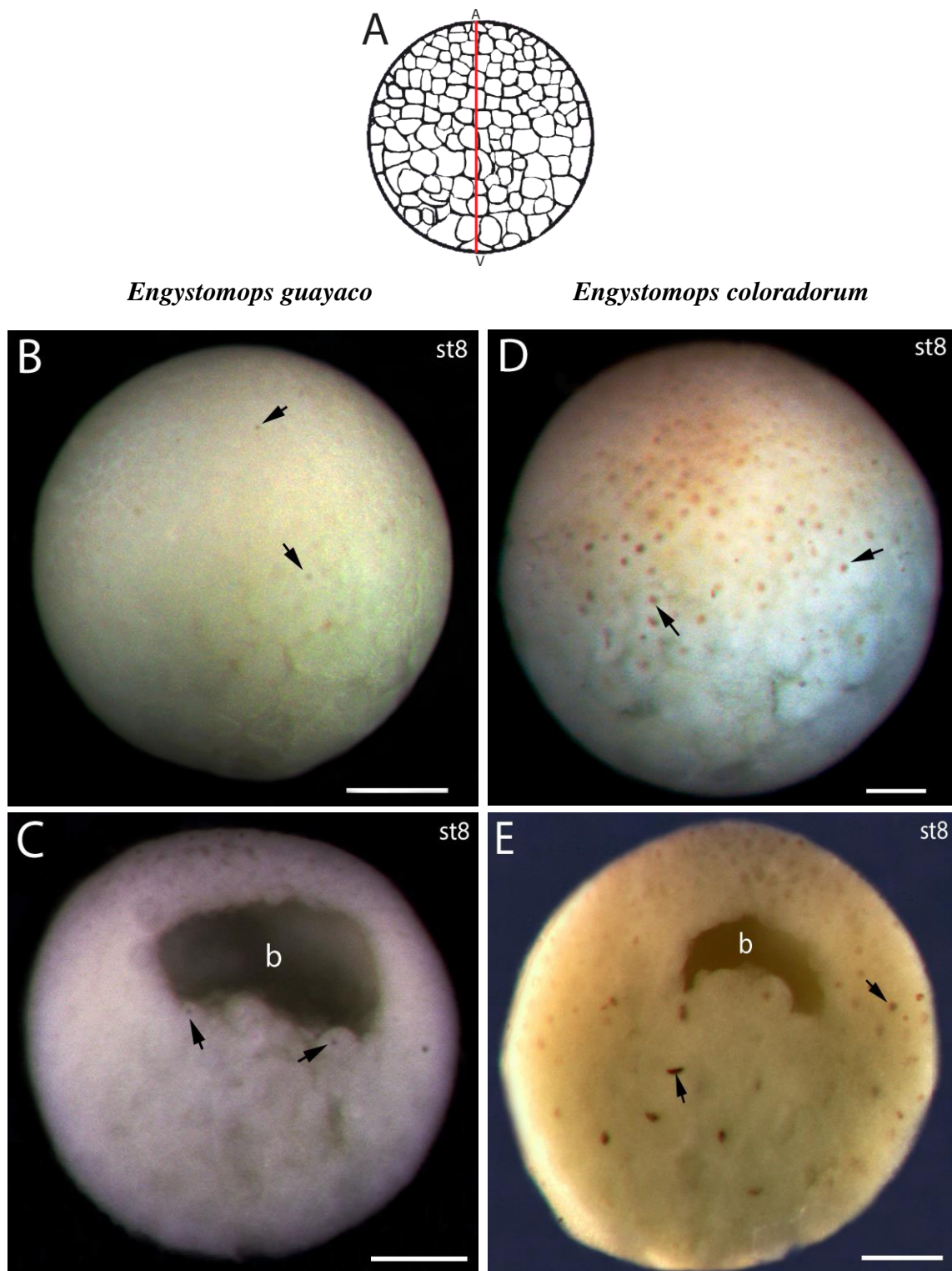
**Figura 4. Morfología del estadio de 32 células de *E. guayaco* (estadio 6):** A y B son vistas laterales. Hemisferio animal orientado hacia arriba. (A) Esquema del embrión que indica la orientación de la bisección sagital que se muestra en D. (B) Embrión en estadio de 32 células. Vista externa. (C) Imagen del hemisferio animal. (D) Bisección sagital. Hemisferio animal orientado hacia arriba. Se observa una pequeña cavidad denominada blastocele. Las barras en B, C y D corresponden a 500  $\mu\text{m}$ .

Fig. 5.



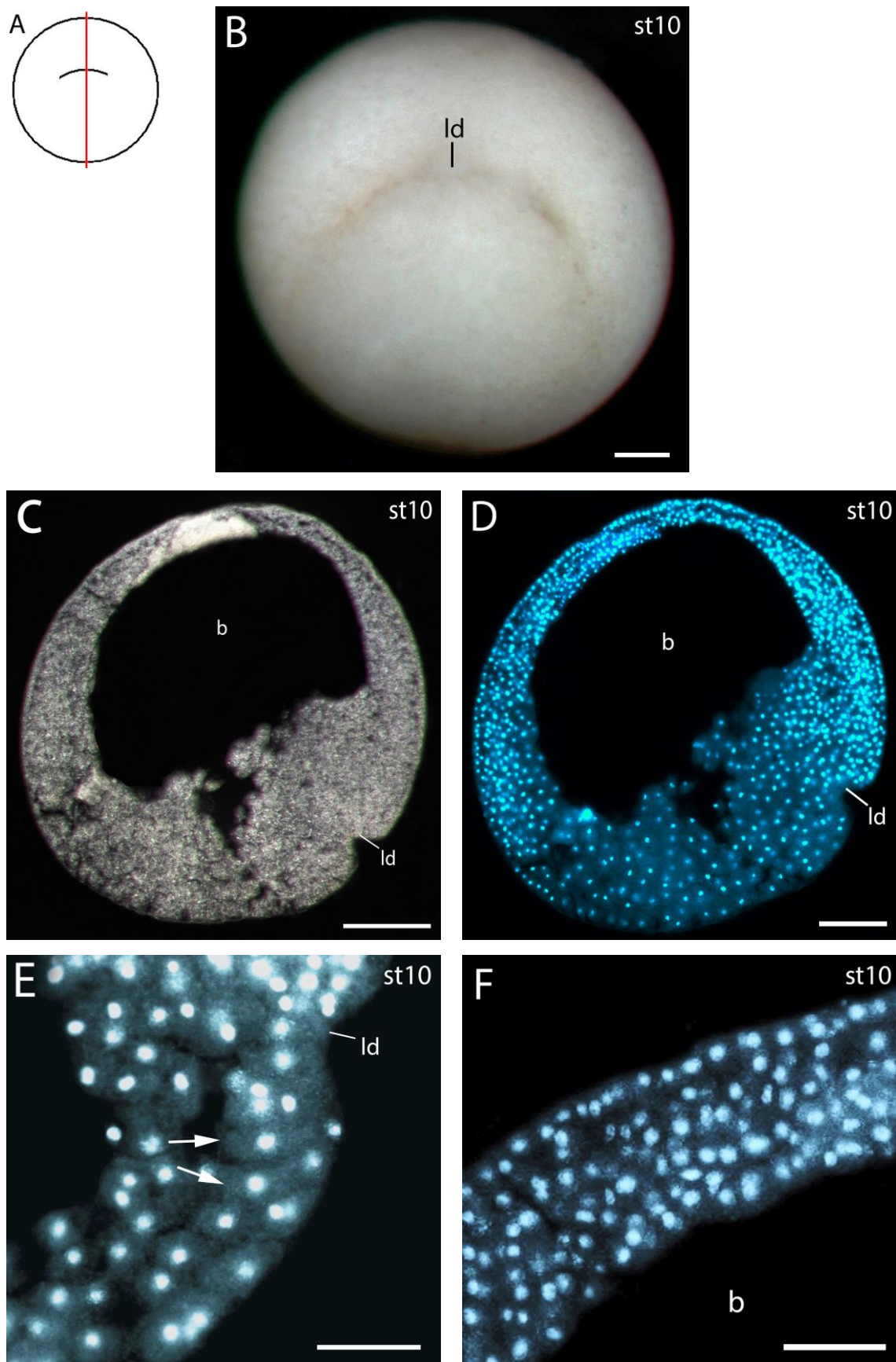
**Figura 5. Morfología del estadio de blástula de células grandes de *E. guayaco* en comparación con *E. coloradum* (estadio 7):** A, B y D son vistas laterales. Hemisferio animal orientado hacia arriba. (A) Esquema del embrión que indica la orientación de la sección y bisección sagital que se muestra en C y E. (B) Blástula de células grandes de *E. guayaco*. Vista externa. La flecha señala pigmento alrededor de los núcleos. (C) Sección sagital de *E. guayaco*. Hemisferio animal orientado hacia arriba. Las flechas señalan pigmento alrededor de los núcleos. El blastocele presenta una mayor extensión (D) Blástula de células grandes de *E. coloradum*. Vista externa. La flecha señala pigmento alrededor de los núcleos. (E) Bisección sagital de *E. coloradum*. Hemisferio animal orientado hacia arriba. Las flechas señalan pigmento alrededor de los núcleos. El blastocele presenta una mayor extensión. Las barras en B y C corresponden a 500  $\mu\text{m}$  y en D y E corresponden a 200  $\mu\text{m}$ .

Fig. 6.

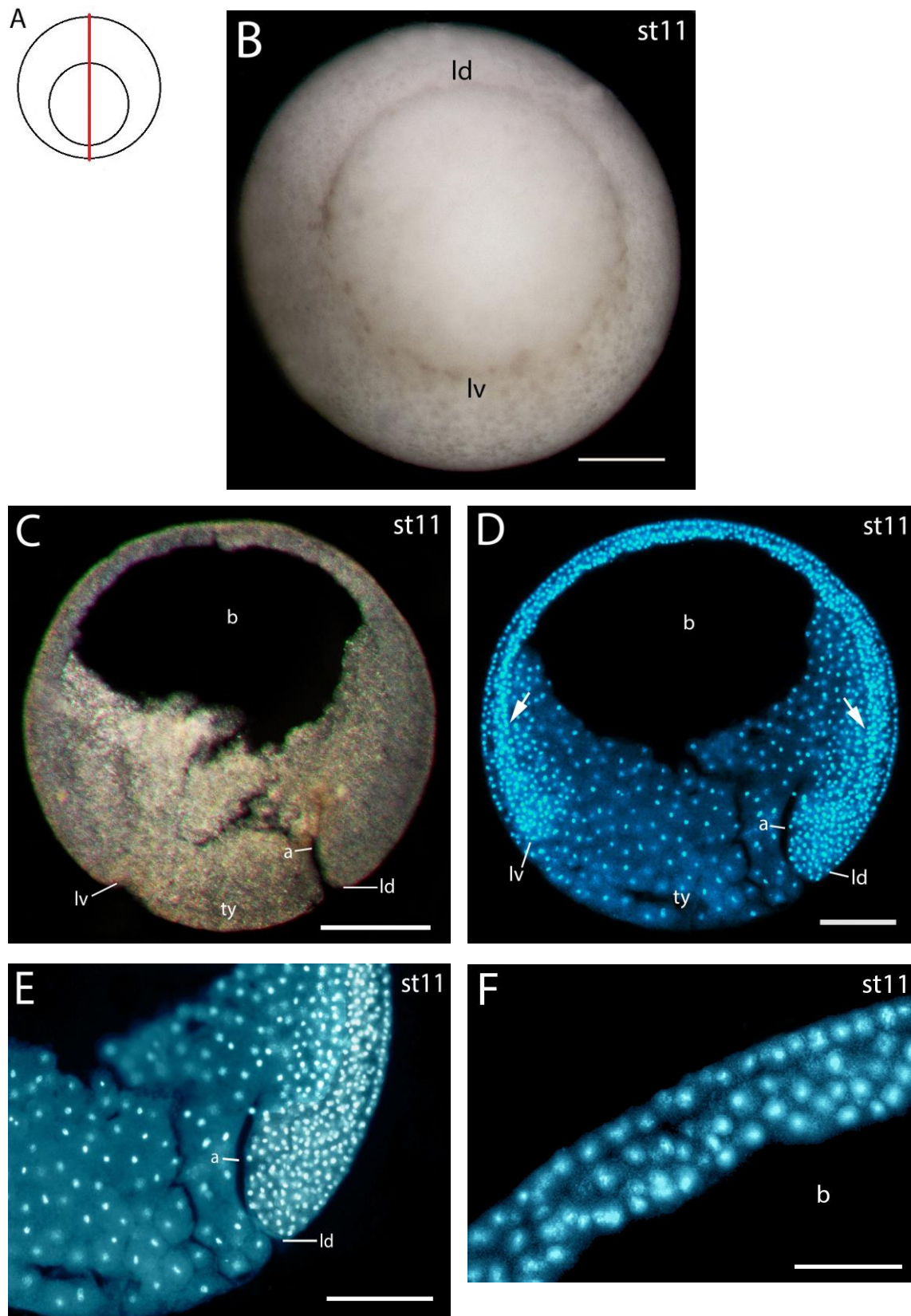


**Figura 6. Morfología del estadio de blástula de células medianas de *E. guayaco* en comparación con *E. coloradum* (estadio 8):** A, B y D son vistas laterales. Hemisferio animal orientado hacia arriba. (A) Esquema del embrión que indica la orientación de la bisección sagital que se muestra en C y E. (B) Blástula de células medianas de *E. guayaco*. Vista externa. Las flechas señalan pigmento alrededor de los núcleos. (C) Bisección sagital de *E. guayaco*. Hemisferio animal orientado hacia arriba. Las flechas señalan pigmento alrededor de los núcleos. El blastocelo presenta un aumento en su extensión (D) Blástula de células medianas de *E. coloradum*. Vista externa. Las flechas señalan pigmento alrededor de los núcleos. (E) Bisección sagital de *E. coloradum*. Hemisferio animal orientado hacia arriba. Las flechas señalan pigmento alrededor de los núcleos. El blastocelo presenta un aumento en su extensión. Las barras en B y C corresponden a 500  $\mu\text{m}$  y en D y E corresponden a 200  $\mu\text{m}$ .



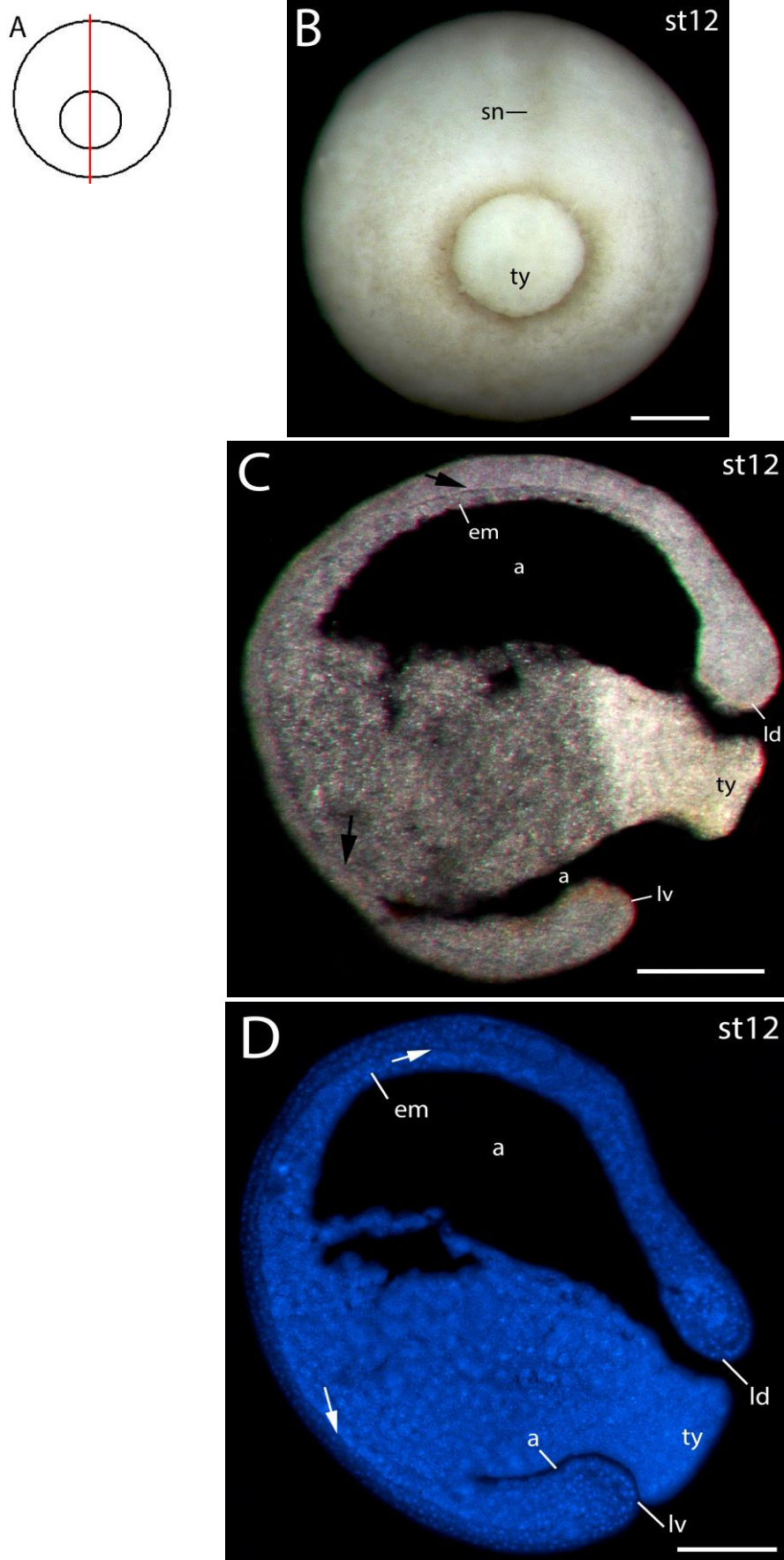
**Fig. 7.**

**Figura 7. Morfología de la gástrula temprana de *E. guayaco* (estadio 10):** A esquema del embrión visto desde el hemisferio vegetal. Lado dorsal orientado hacia arriba. B es una vista lateral, desde el lado dorsal del embrión. (A) Esquema del embrión que indica la orientación de la sección sagital que se muestra en C y D. (B) Gástrula temprana. Vista externa. Se observa el labio dorsal del blastoporo. (C) Sección sagital. Se observa el labio dorsal del blastoporo orientado hacia la derecha. (D) Fluorescencia nuclear de la sección sagital en C. (E) Acercamiento del labio dorsal del blastoporo de la sección en D. Las flechas señalan células en forma de botella. (F) Acercamiento del techo del blastocele de la sección en D. Se observa que el techo del blastocele está formado de 4 a 5 capas de células. La barra en B corresponde a 200  $\mu\text{m}$ , C corresponde a 500  $\mu\text{m}$ , D y E corresponden a 100  $\mu\text{m}$  y F corresponde a 50  $\mu\text{m}$ .

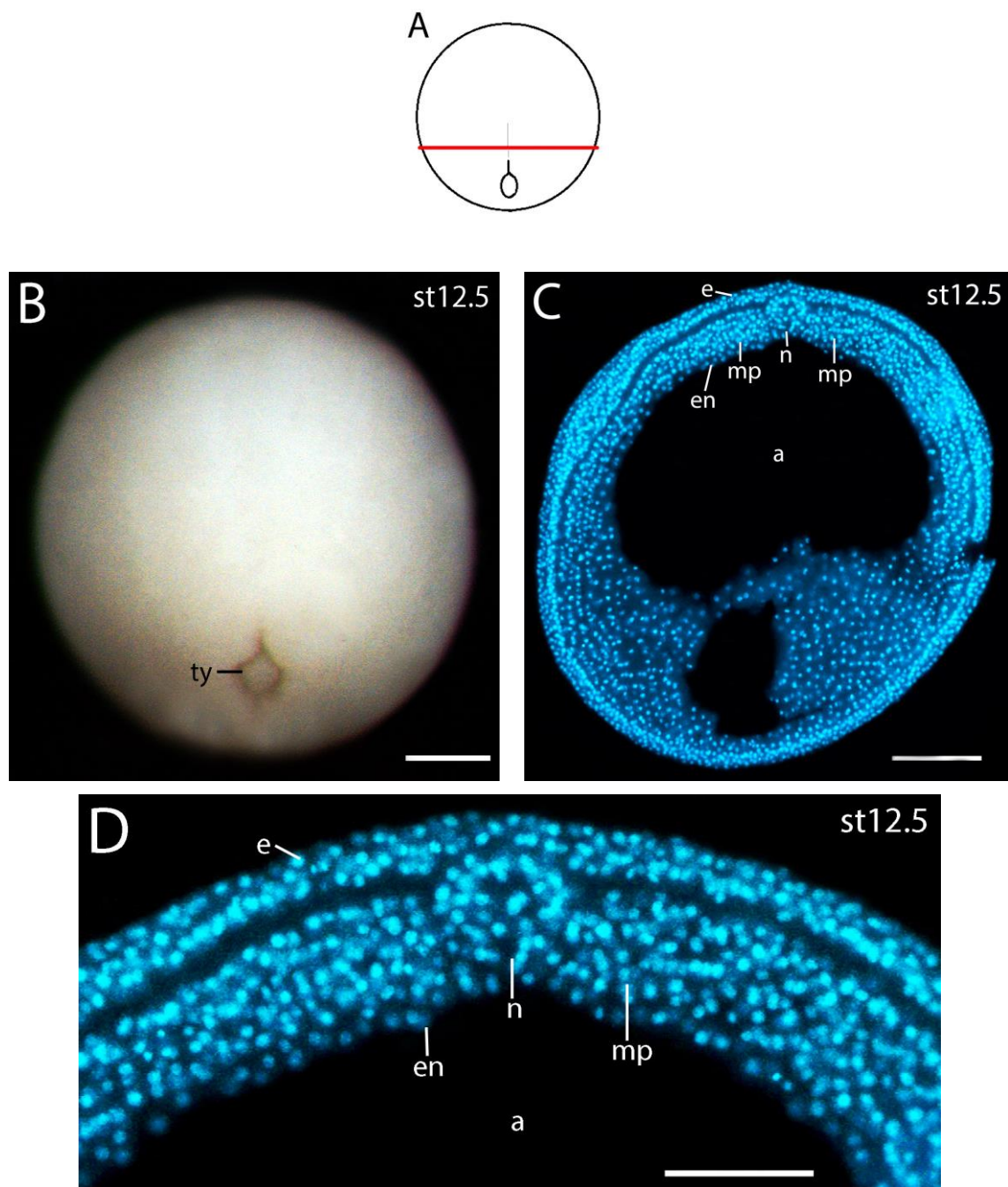
**Fig. 8.**



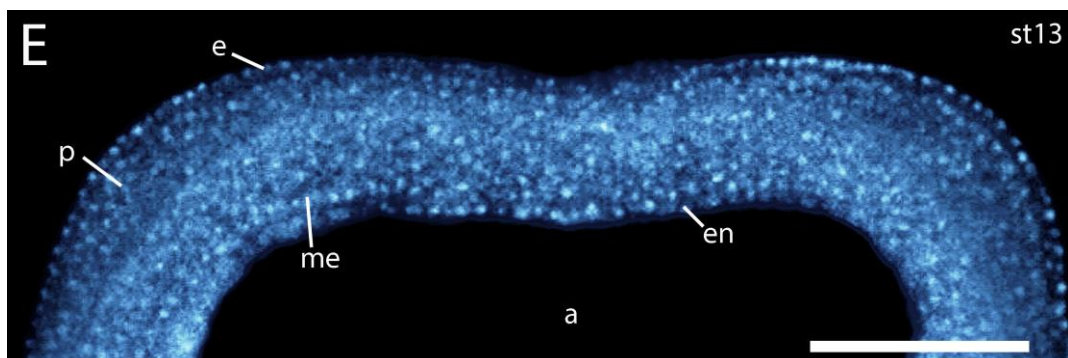
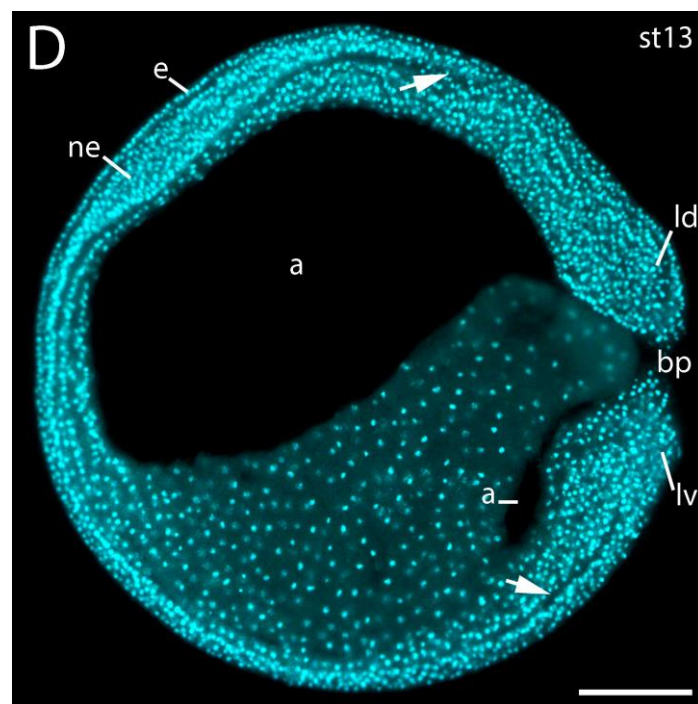
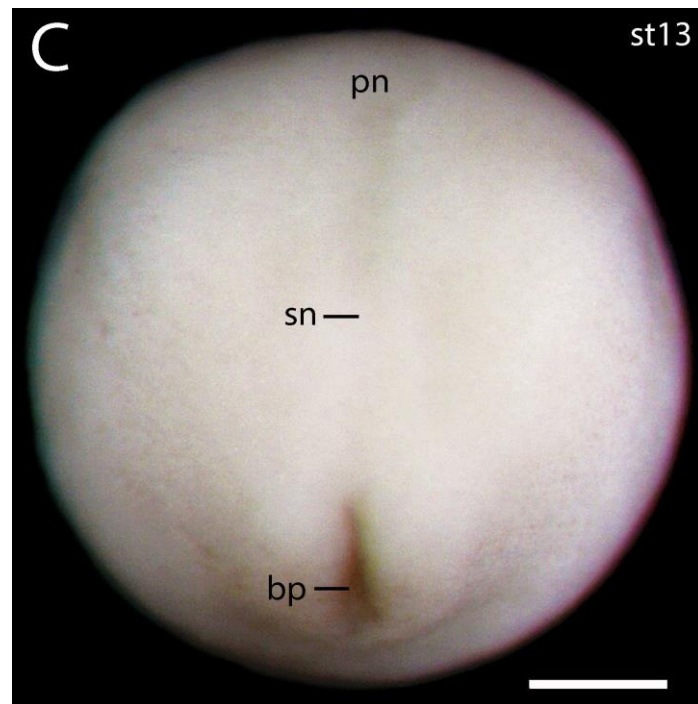
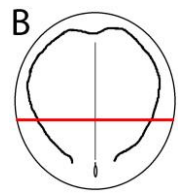
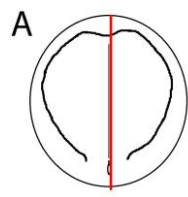
**Figura 8. Morfología del estadio de gástrula media de *E. guayaco* (estadio 11):** A es esquema del embrión visto desde el hemisferio vegetal. Lado dorsal orientado hacia arriba. B es una vista lateral, desde el lado dorsal del embrión. (A) Esquema del embrión que indica la orientación de la sección sagital que se muestra en C y D. (B) Gástrula media. Vista externa. Se observa el labio dorsal y ventral del blastoporo. (C) Sección sagital. Se observa el labio dorsal del blastoporo a la derecha y el labio ventral a la izquierda. (D) Fluorescencia nuclear de la sección en C. Las flechas señalan el cleft de Brachet. (E) Acercamiento del labio dorsal del blastoporo de la sección en D. (F) Acercamiento del techo del blastocele de la sección en D. Se observa que el techo del blastocele está formado por 2 a 3 capas de células. La barra en B corresponde a 200  $\mu\text{m}$ , C corresponde a 500  $\mu\text{m}$ , D y E corresponden a 100  $\mu\text{m}$  y F corresponde a 50  $\mu\text{m}$ .

**Fig. 9.**

**Figura 9. Morfología de la gástrula tardía de *E. guayaco* (estadio 12):** (A) Esquema del embrión que indica la orientación de la sección sagital que se muestra en C y D. (B) Gástrula tardía. Vista externa. Se observa el surco neural y un tapón de yema mediano (C) Sección sagital. Muestra la extensión del arquenterón. Las flechas señalan el cleft de Brachet. (D) Fluorescencia nuclear de una sección transversal. Las flechas señalan el cleft de Brachet. Las barras en B y D corresponden a 200  $\mu\text{m}$  y en C corresponde a 500  $\mu\text{m}$ .

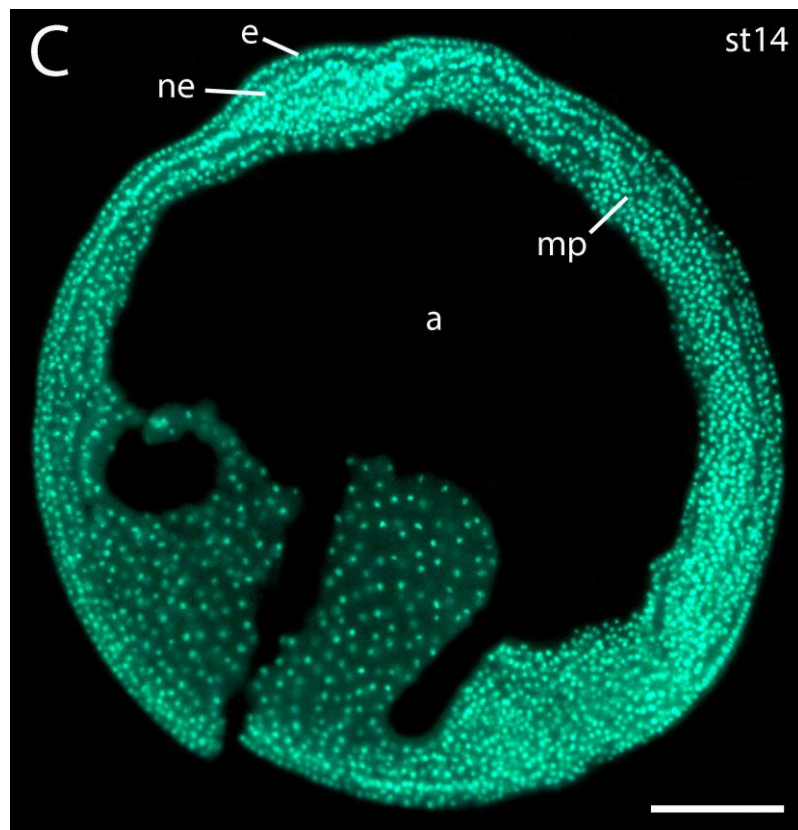
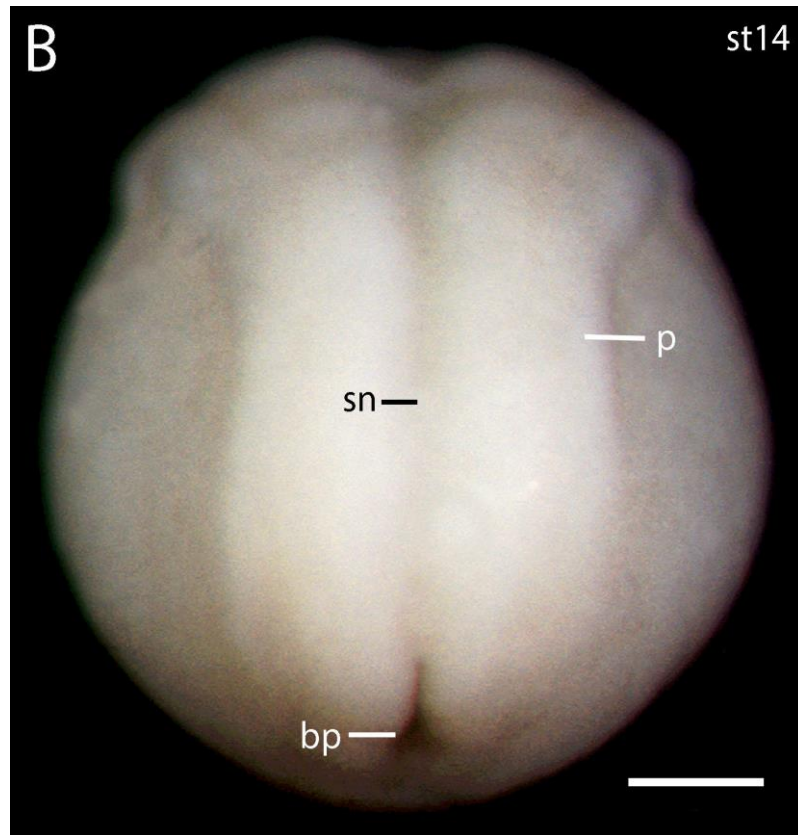
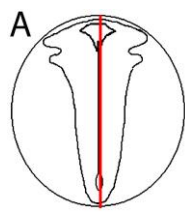
**Fig. 10.**

**Figura 10. Morfología de la gástrula tardía de *E. guayaco* (estadio 12.5):** A y B son vistas posteriores. Lado dorsal orientado hacia arriba. (A) Esquema del embrión que indica la orientación de la sección transversal que se muestra en C. (B) Gástrula tardía. Vista externa Se observa un tapón de yema pequeño. (C) Fluorescencia nuclear de la sección transversal anterior. Se observa el notocordio. (D) Acercamiento del techo del arquenterón con fluorescencia nuclear de la sección en C. Se observa el ectodermo, mesodermo paraxial, recubrimiento endodermal y el notocordio. La barra en B corresponde a 200  $\mu\text{m}$ , en C corresponde a 100  $\mu\text{m}$  y en D corresponde a 50  $\mu\text{m}$ .

**Fig. 11.**

**Figura 11. Morfología de la post-gástrula de *E. guayaco* (estadio 13):** A, B y C son vistas posteriores. Lado dorsal orientado hacia arriba. (A) Esquema del embrión que indica la orientación de la sección sagital que se muestra en D. (B) Esquema del embrión que indica la orientación de la sección transversal que se muestra en E. (C) Post-gástrula. Vista externa. Se observa el blastoporo, la placa neural y el surco neural. (D) Fluorescencia nuclear de la sección sagital. Las flechas señalan el cleft de Brachet. Se observa la extensión del arquenterón, el ectodermo y el blastoporo. Nótese el engrosamiento en la parte superior izquierda, corresponde al neuroectodermo. (E) Fluorescencia nuclear de la sección transversal anterior. Se observa ectodermo, mesodermo, recubrimiento endodermal. Las barras en C y E corresponden a 200  $\mu\text{m}$  y en D corresponde a 100  $\mu\text{m}$ .

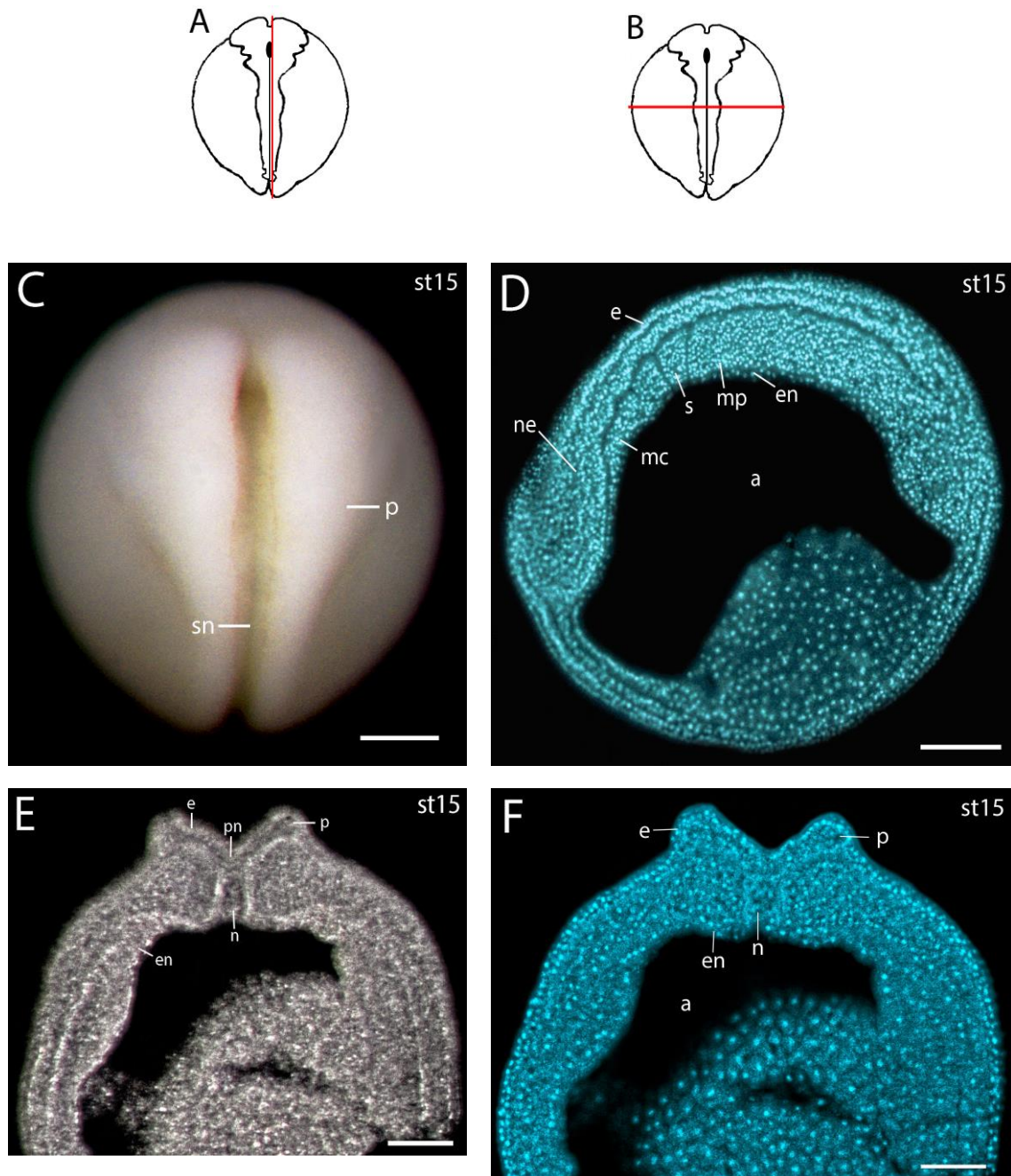


**Fig. 12.**

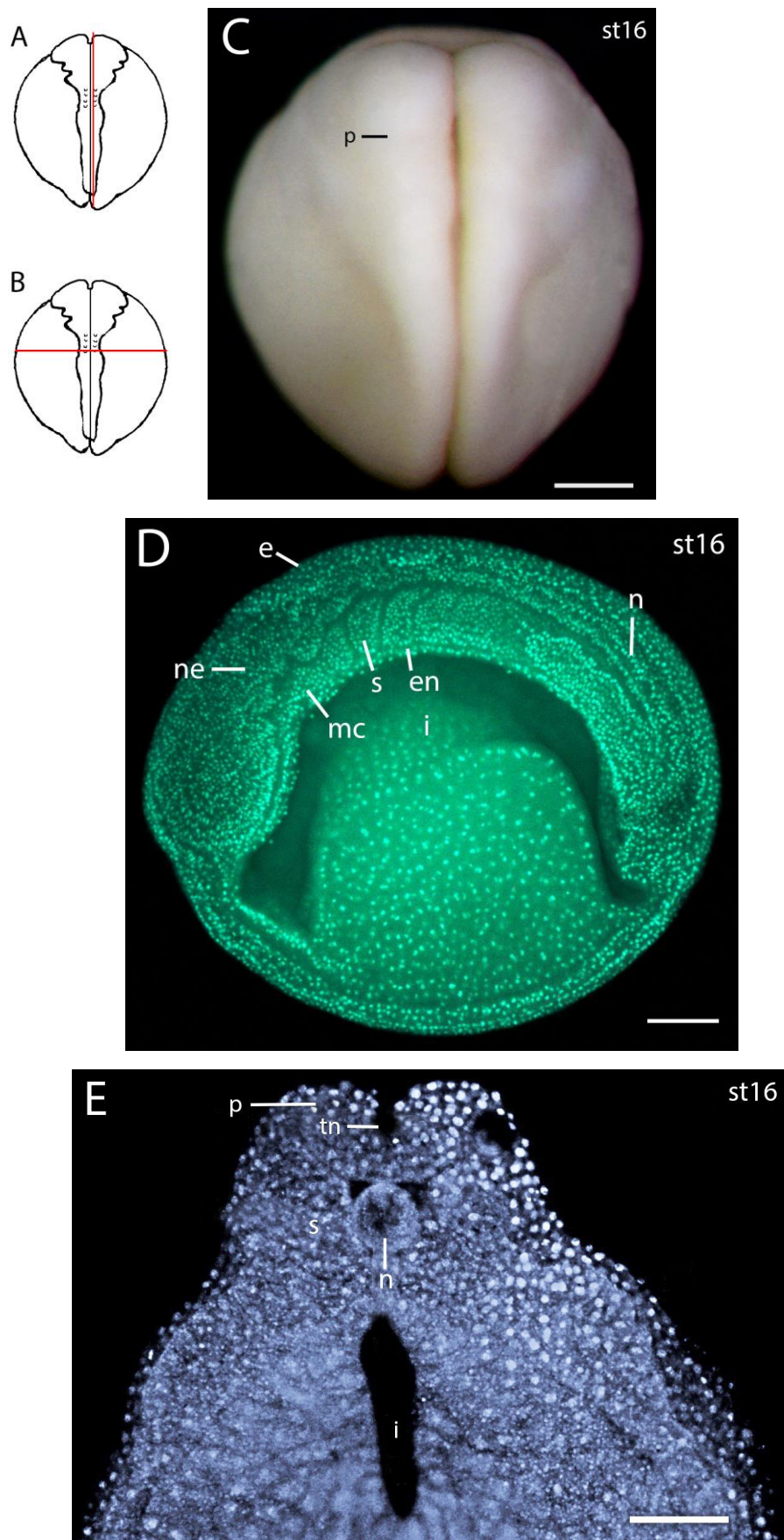


**Figura 12. Morfología del estadio de néurula temprana de *E. guayaco* (estadio 14):**

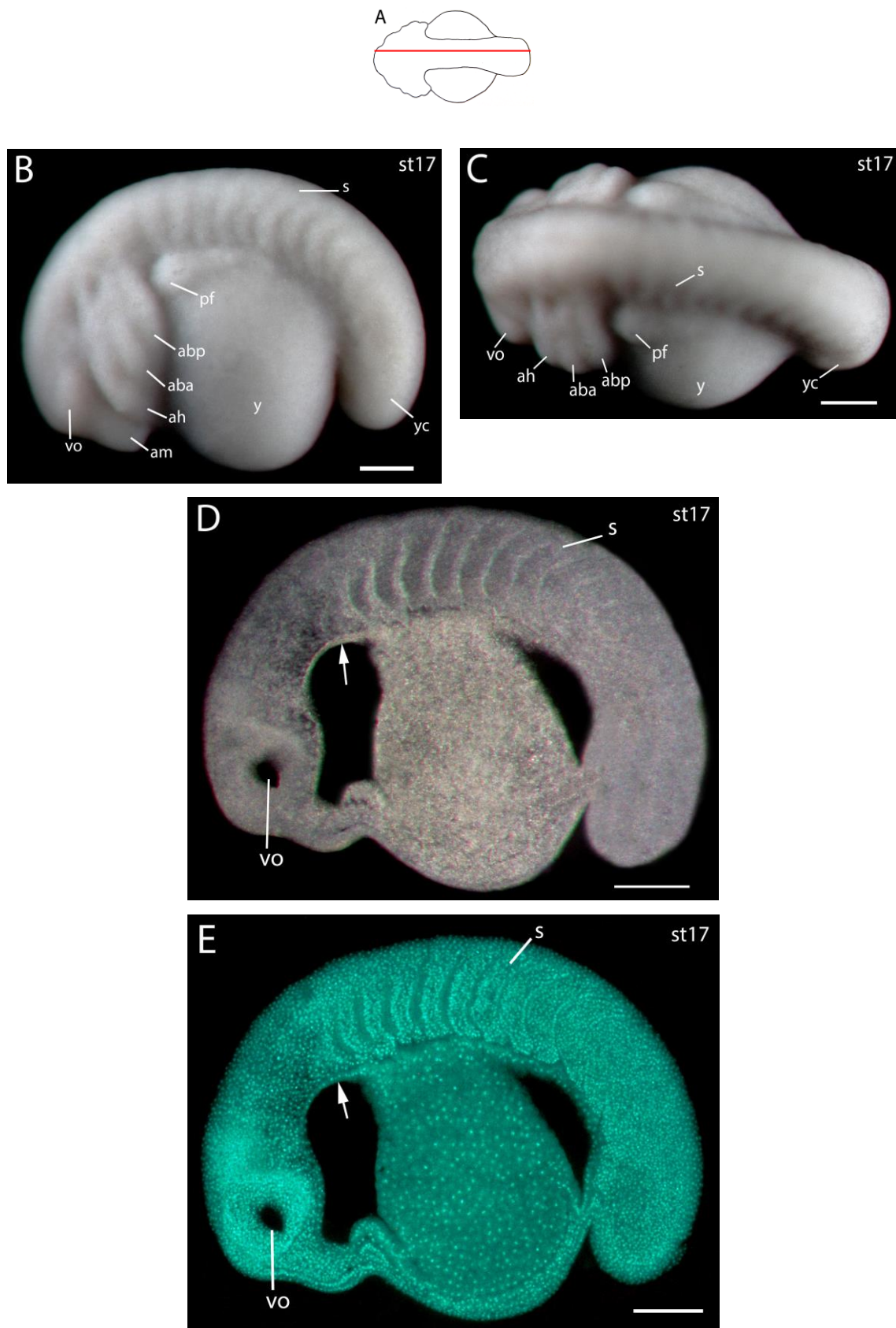
A y B son vistas dorsales, la región rostral está orientada hacia arriba. (A) Esquema del embrión que indica la orientación de la sección sagital que se muestra en C. (B) Néurula temprana. Vista externa. Se observa el blastoporo, los pliegues neurales y el surco neural. (C) Fluorescencia nuclear de la sección sagital. Se observa ectodermo, mesodermo paraxial. La barra en B corresponde a 200  $\mu\text{m}$  y la barra en C corresponde a 100  $\mu\text{m}$ .

**Fig. 13.**

**Figura 13. Morfología del estadio de néurula media de *E. guayaco* (estadio 15):** A, B y C son vistas dorsales, la región rostral está orientada hacia arriba. (A) Esquema del embrión que indica la orientación de la sección sagital que se muestra en D. (B) Esquema del embrión que indica la orientación de la sección transversal que se muestra en E y F. (C) Néurula media. Vista externa. Se observa los pliegues neurales y el surco neural. (D) Fluorescencia nuclear de la sección sagital. Se observa ectodermo, mesodermo de la cabeza y paraxial, endodermo y somitas. (E) Sección transversal. Se observa los pliegues neurales y el notocordio. (F) Fluorescencia nuclear de la sección transversal en E. Se observa los pliegues neurales, notocordio y recubrimiento endodermal. Las barras en C y E corresponden a 200  $\mu\text{m}$  y en D y F corresponde a 100  $\mu\text{m}$ .

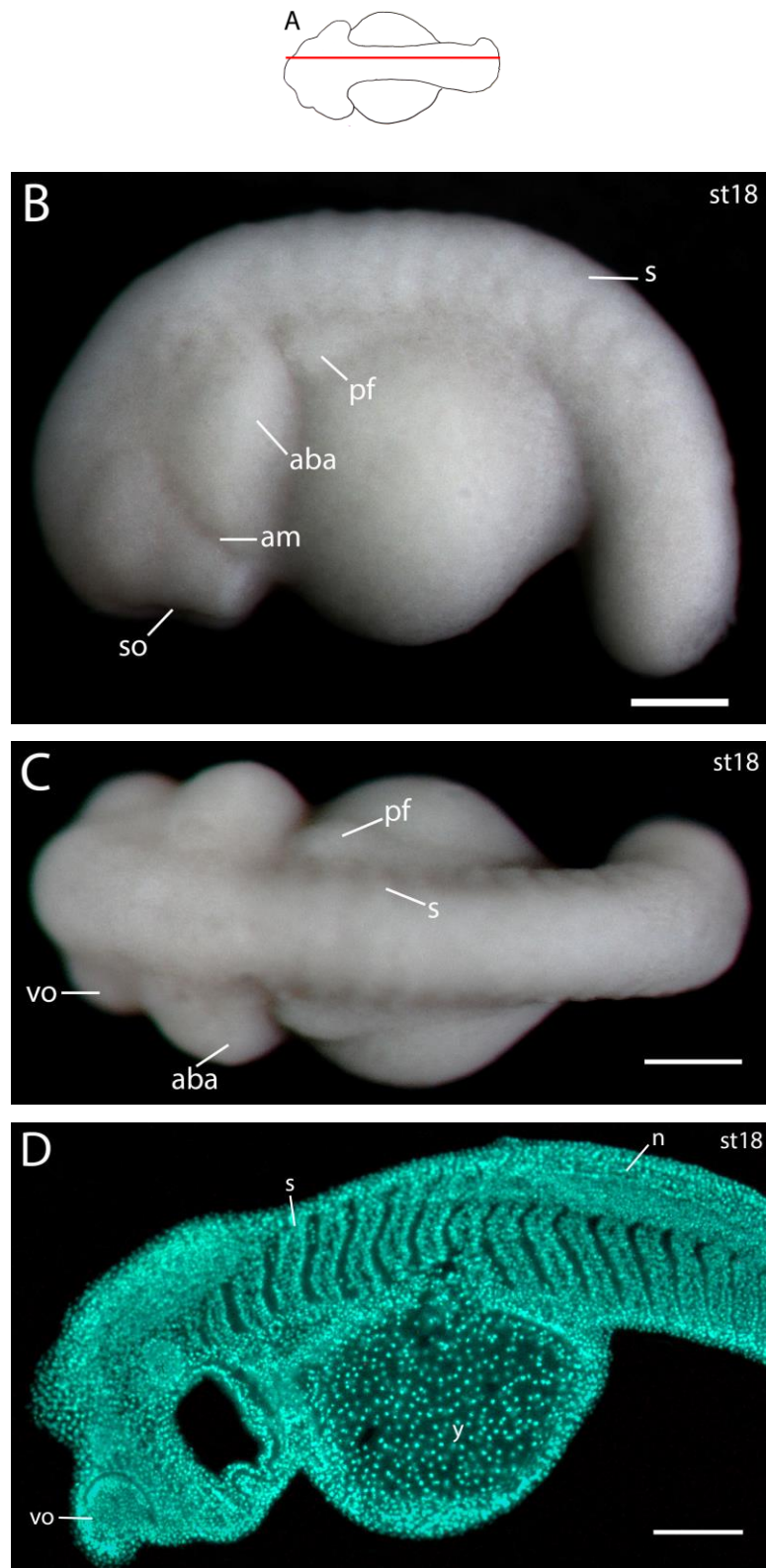
**Fig. 14.**

**Figura 14. Morfología del estadio de néurula tardía de *E. guayaco* (estadio 16):** A, B y C son vistas dorsales, la región rostral está orientada hacia arriba. (A) Esquema del embrión que indica la orientación de la sección sagital que se muestra en D. (B) Esquema del embrión que indica la orientación de la sección transversal que se muestra en E. (C) Néurula tardía. Vista externa. Se observan los pliegues neurales a punto de fusionarse en la línea media. (D) Fluorescencia nuclear de la sección sagital. Se observa ectodermo, endodermo, mesodermo de la cabeza, somitas y notocordio. (E) Fluorescencia nuclear de la sección transversal. Se observan los pliegues neurales, el tubo neural, somitas y el notocordio. La barra en C corresponde a 200  $\mu\text{m}$  y en D y E corresponden a 100  $\mu\text{m}$ .

**Fig. 15.**

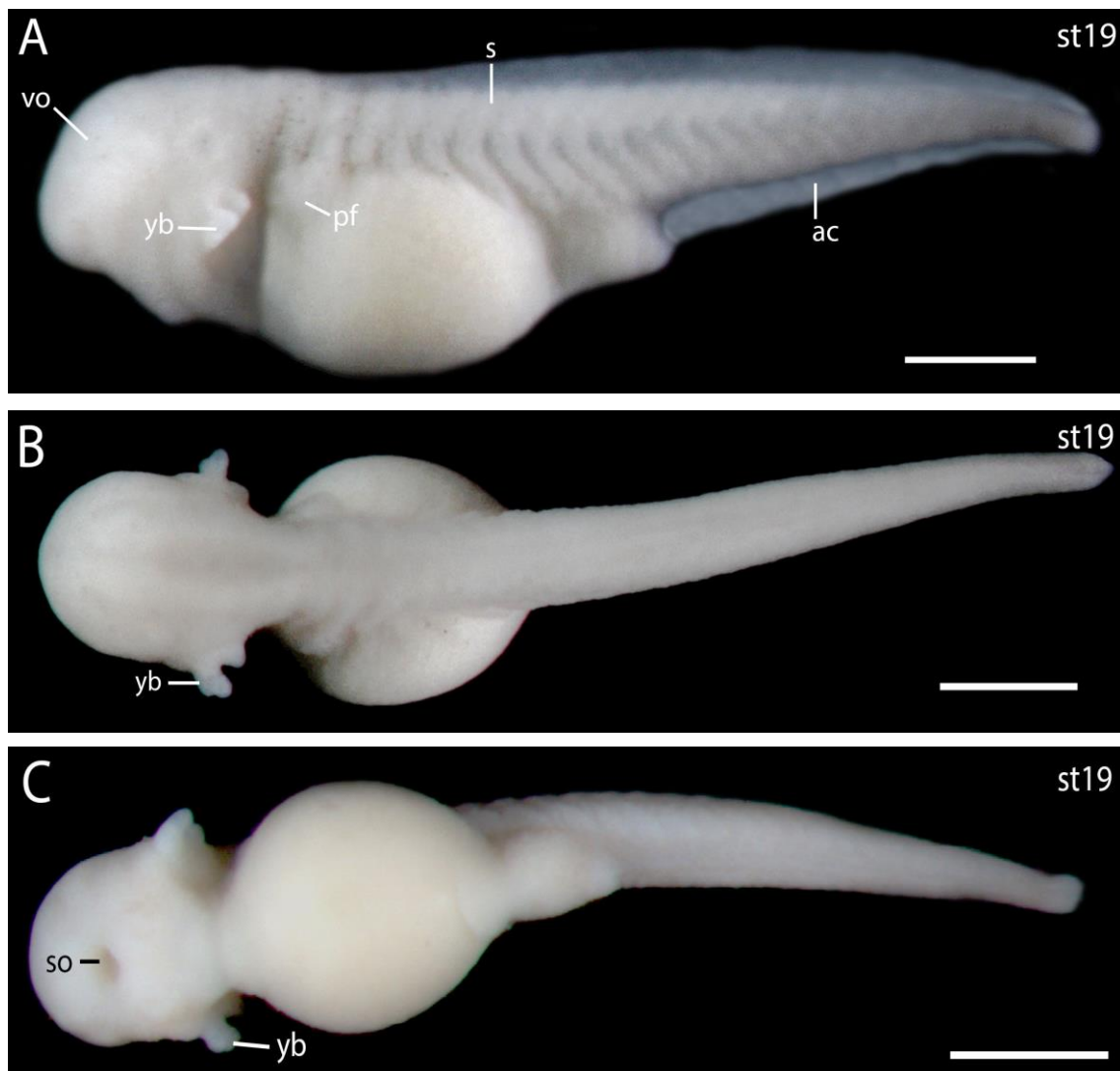


**Figura 15. Morfología del estadio de yema de la cola de *E. guayaco* (estadio 17):** A, B y C son vistas dorsales, la región rostral está orientada hacia la izquierda. (A) Esquema del embrión que señala la orientación de la sección sagital que se muestra en D. (B) Vista externa lateral del embrión en estadio de yema de la cola. Se observa la vesícula óptica, el arco mandibular, arco hioideo, arco branquial anterior, arco branquial posterior, pronefros, somitas y la yema de la cola. (C) Vista externa dorsal. (D) Sección sagital. Se observan somitas y la vesícula óptica. (E) Fluorescencia nuclear de la sección en D. Se observan detalladamente somitas, la flecha señala recubrimiento endodermal. Las barras en B y C corresponden a 200  $\mu\text{m}$ , en D corresponde a 500  $\mu\text{m}$  y en E corresponde a 100 $\mu\text{m}$ .

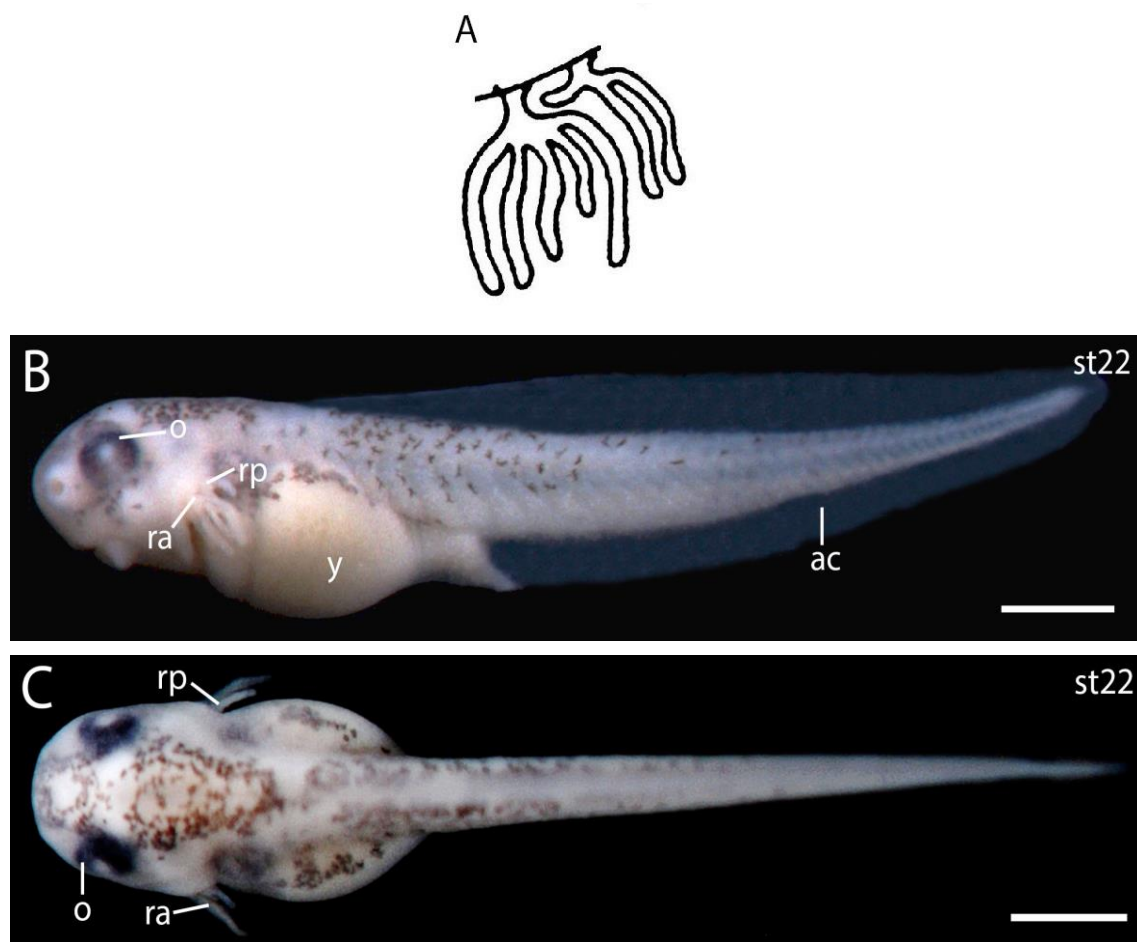
**Fig. 16.**



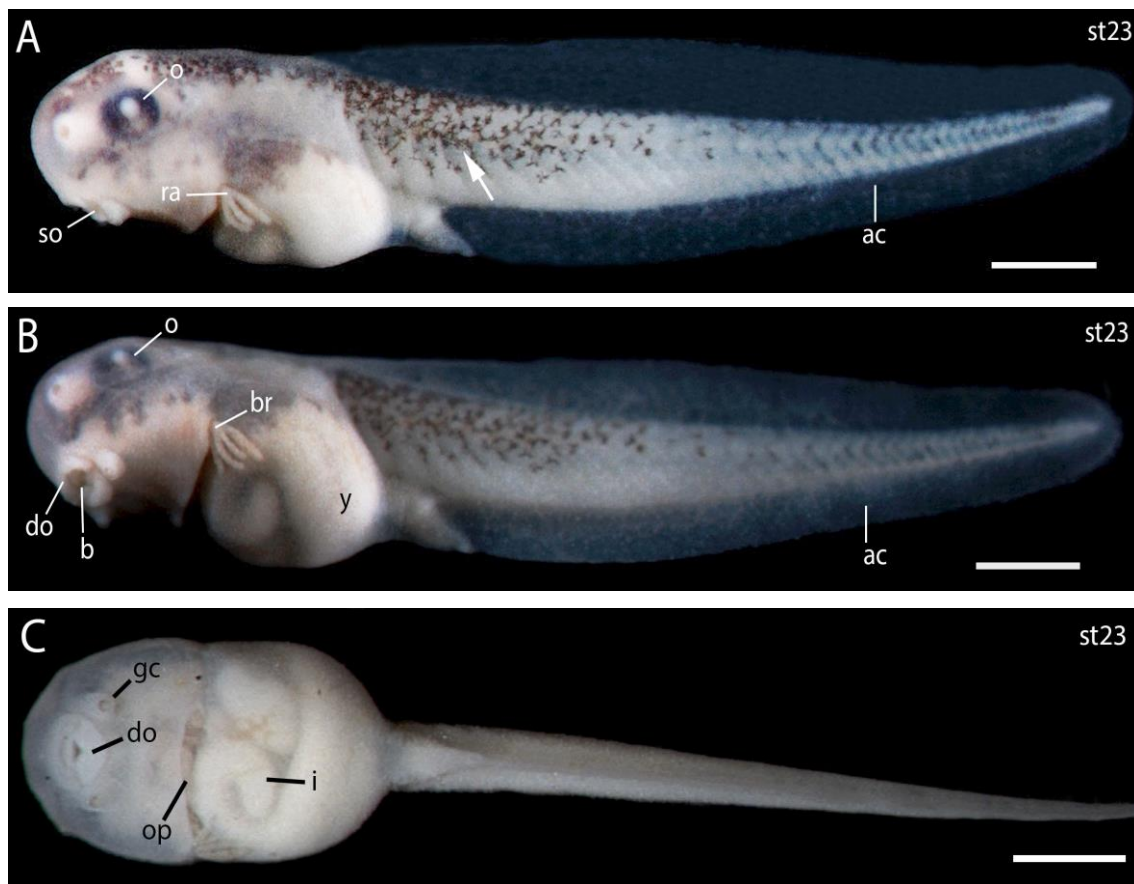
**Figura 16. Morfología del estadio de respuesta muscular de *E. guayaco* (estadio 18):** A y C son vistas dorsales, B es una vista lateral. La región rostral está orientada hacia la izquierda. (A) Esquema del embrión que indica la orientación de la sección sagital que se muestra en D. (B) Embrión entero en el estadio de respuesta muscular. Se observa el arco mandibular, el arco branquial anterior, el estomodeo, pronefros y somitas. (C) Vista externa dorsal. (D) Fluorescencia nuclear de la sección sagital. Se observan somitas, la vesícula óptica y el notocordio. Las barras en B y C corresponden a 200  $\mu\text{m}$  y en D corresponde a 100  $\mu\text{m}$

**Fig. 17.**

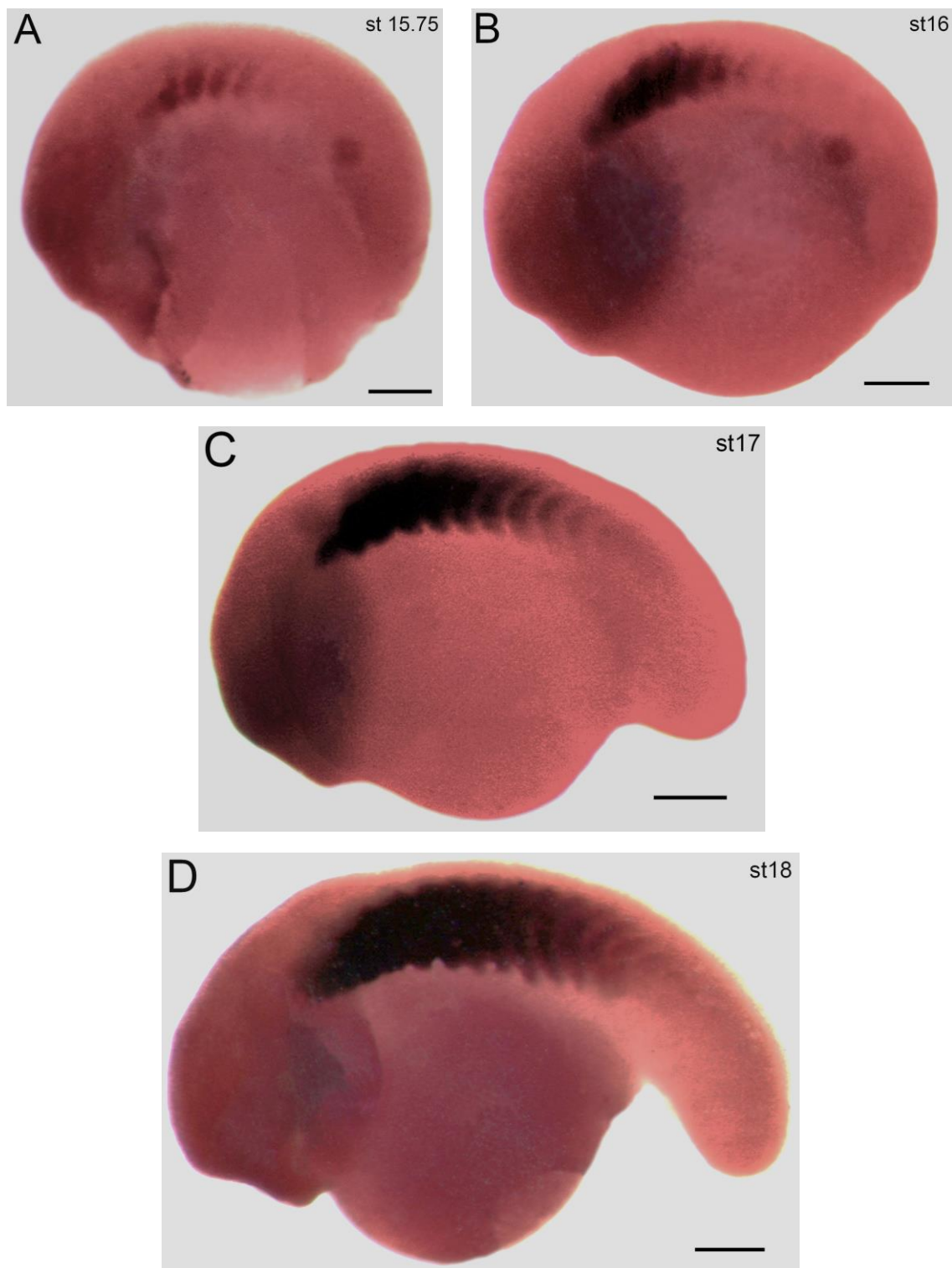
**Figura 17. Morfología del estadio de la yema de las branquias de *E. guayaco* (estadio 19):** La región rostral en A, B y C está orientada hacia la izquierda. (A) Embrión entero en el estadio de yema de las branquias. Vista externa lateral. Se observa la vesícula óptica, el pronefros y somitas (B) Embrión entero en el estadio de yema de las branquias. Vista externa dorsal. Se observa la yema de las branquias. (C) Embrión entero en el estadio de yema de las branquias. Vista externa ventral. Se observa el estomodeo. Las barras en A, B y C corresponden a 500  $\mu\text{m}$ .

**Fig. 18.**

**Figura 18. Morfología del estadio de desarrollo completo de las branquias de *E. guayaco* (estadio 22):** La región rostral en B y C está orientada hacia la izquierda. B es una vista lateral. C es una vista dorsal. (A) Esquema de las branquias de un embrión en estadio de desarrollo completo de las branquias que se muestra en B. Se observan las ramas de las branquias en su máxima extensión. La rama anterior posee 5 ramificaciones y la rama posterior 3 ramificaciones. (B) Embrión entero en estadio de desarrollo completo de las branquias. Vista externa lateral. Se observa la rama anterior y posterior de las branquias. (C) Vista externa dorsal. Se observa pigmento en la región dorsal del cuerpo del embrión. Las barras en B y C corresponden a 500  $\mu$ m.

**Fig. 19.**

**Figura 19. Morfología de los embriones a eclosionar de *E. guayaco* (estadio 23):** La región rostral en A, B y C está orientada hacia la izquierda. (A) Embrión a la eclosión. Vista lateral. Se observa la aleta de la cola, musculo de la cola, la flecha señala pigmento en la región dorsal del cuerpo del embrión. (B) Embrión a la eclosión. Vista lateral. Se observa la boca. (C) Embrión a la eclosión. Vista ventral. Se observa el disco oral, las glándulas de cemento, el opérculo, el enrollamiento del intestino. Se observa una reducción en el tamaño de las branquias. Las barras en A, B y C corresponden a 500  $\mu\text{m}$ .

**Fig. 20.**

**Figura 20. Expresión de proteínas musculares en los estadios 15.75, 16, 17 y 18 de *E. guayaco*:** La región rostral en A, B, C y D está orientada hacia la izquierda. (A) Embrión entero en estadio de néurula tardía con inmunodetección con el anticuerpo 12/101. Se observan 4-5 somitas con tinción positiva. (B) Embrión entero en estadio de néurula tardía con inmunodetección con el anticuerpo 12/101. Se observan 7-8 somitas con tinción positiva. (C) Embrión entero en estadio de yema de la cola con inmunodetección con el anticuerpo 12/101. Se observan de 10 somitas con tinción positiva. (D) Embrión entero en estadio de respuesta muscular con inmunodetección con el anticuerpo 12/101. Se observan 15 somitas con tinción positiva. Las barras en A, B, C y D corresponden a 200  $\mu\text{m}$ .

## **9. TABLAS**

**Tabla 1. Posturas obtenidas de *E. guayaco***

Codificación de la postura	Fecha de encuentro de la postura	Estadio	Número de embriones	
			Totales	Fijados
Eg-013 <sup>a</sup>	19/06/2012	12	190	173
Eg-016	06/08/2012	10	165	133
Eg-017	10/09/2012	21	170	70
Eg-019	13/08/2013	22	162	10
Eg-020	06/09/2013	6	145	48
Eg-021	04/06/2014	1	134	138
Eg-022	16/07/2014	13	156	60
Eg-023	19/08/2014	10	188	82
<b>Total</b>			1310	714
<b>Promedio</b>			164	

<sup>a</sup>Eg y un número de 3 cifras representa la codificación de la postura. Eg-013 = *Engystomops guayaco*, treceava postura.



**Tabla 2. Tiempos del desarrollo en horas y días de los embriones de *E. guayaco*.**

<b>Postura:</b>	<b>Eg-013</b>	<b>Eg-016</b>	<b>Eg-017</b>	<b>Eg-019</b>	<b>Eg-020</b>	<b>Eg-021</b>	<b>Eg-022</b>	<b>Eg-023</b>
<b>Fecha</b>	19/06/2	06/08/2	10/09/2	13/08/2	06/09/2	04/06/2	16/07/2	19/08/2
<b>inicio:</b>	012	012	012	013	013	014	014	014
<b>Fecha</b>	21/06/2	09/08/2	11/09/2	13/08/2	09/09/2	07/06/2		22/08/2
<b>eclosión:</b>	012	012	012	013	013	014		014
<b>st1</b>						0:00		
<b>st2</b>						0:25		
<b>st3</b>						0:48		
<b>st4</b>								
<b>st5</b>								
<b>st6</b>					0:00	1:65		
<b>st7</b>					1:23	3:00		
<b>st8</b>					3:19	5:03		
<b>st9</b>						7:10		
<b>st10</b>		0:00			6:47	10:02		0:00
<b>st11</b>		2:50			9:40	13:10		3:17
<b>st12</b>	0:00 <sup>a</sup>	5:00			12:35	16:14		6:00
<b>st13</b>	3:10	8:45			15:40	19:25	0:00	8:38
<b>st14</b>	5:45	11:30			19:00	22:30	3:10	11:50
<b>st15</b>	7:55	14:10			22:26	25:38	6:25	15:18
<b>st16</b>	10:20	17:03			24:56	28:02	9:40	18:00
<b>st17</b>	13:10	20:15			30:46	31:11	13:00	21:23
<b>st18</b>	18:30	24:35			35:08	37:00	17:23	25:01
<b>st19</b>	30:22	33:48			47:22	55:12	29:45	40:11
<b>st20</b>								
<b>st21</b>	44:08		0:00					49:06
<b>st22</b>	50:00	58:20	15:40	0:00	67:23	72:10		57:00
<b>st23</b>	62:10	69:55	23:55	8:10	73:18	77:23		74:16
<b>Tiempo (DÍAS)<sup>b</sup>:</b>					<b>3</b>	<b>3</b>		

<sup>a</sup>0:00 = Es el tiempo de inicio de las observaciones.

<sup>b</sup>Tiempo (DÍAS): Este dato fue estimado a partir de las posturas Eg-020 y Eg-021, las posturas más completas.

**Tabla 3. Tiempo de gastrulación en horas de los embriones de *E. guayaco*.**

	<b>Estadio</b>	<b>Tiempo (Horas)</b>
<b>Inicio de la gastrulación</b>	10	0:00 <sup>a</sup>
	11	3:00
	12	6:00
	12.75	9:00
<b>Final de la gastrulación</b>	13	12:00
	<b>Tiempo de gastrulación<sup>b</sup></b>	12:00

---

<sup>a</sup>0:00 = Es el tiempo de inicio de las observaciones.

<sup>b</sup>Tiempo de gastrulación: Calculado a partir del promedio de los tiempos de gastrulación de los embriones de cada postura.

**Tabla 4. Comparación entre el diámetro del huevo y tiempos del desarrollo en varias especies de anuros.**

<b>Familia/Especie</b>	<b>Diámetro huevo (mm)</b>	<b>Tiempo de gastrulación (horas)<sup>a</sup></b>	<b>Tiempo de desarrollo (horas)<sup>b</sup></b>	<b>Referencia</b>
<b>Pipidae</b>				
<i>Xenopus laevis</i>	1,2	6	14	Niewkoop y Faber, 1994
<b>Leptodactylidae</b>				
<i>Engystomops randi</i>	1.1	12.5	72	Romero-Carvajal <i>et al.</i> , 2009
<i>Engystomops coloradum</i>	1.3	12.5	72	Romero-Carvajal <i>et al.</i> , 2009
<i>Engystomops guayaco</i>	<b>0.9</b>	<b>12</b>	<b>72</b>	
<b>Centrolenidae</b>				
<i>Hyalinobatrachium fleischmanni</i>	2.1	24	115	Salazar y del Pino, 2015
<i>Espadarana callistomma</i>	2.1	23	288	Salazar y del Pino, 2015
<b>Dendrobatidae</b>				
<i>Epipedobates machalilla</i>	1.6	65	96	del Pino <i>et al.</i> 2004
<b>Hemiphractidae</b>				
<i>Gastrotheca riobambae</i>	3	168	336	del Pino y Escobar, 1981

<sup>a</sup>El tiempo de gastrulación es el tiempo que tardan los embriones desde la formación del labio dorsal hasta el cierre del blastoporo.

<sup>b</sup>El tiempo del desarrollo es el tiempo que tardan los embriones desde la fertilización hasta la eclosión de los renacuajos.

**Tabla 5. Lista de fotografías y créditos**

<b>Figura</b>	<b>Negativo</b>	<b>Especie</b>	<b>Iluminación</b>	<b>Fecha</b>	<b>Crédito</b>
1A	SNAP-150221-0003	<i>E. guayaco</i>	Luz directa	10/07/2014	C. Andrade
1B	SNAP-143823-0004	<i>E. guayaco</i>	Luz directa	16/09/2014	C. Andrade
1C	SNAP-145745-0017	<i>E. guayaco</i>	Luz directa	16/09/2014	C. Andrade
1D	SNAP-151714-0025	<i>E. guayaco</i>	Luz directa	16/09/2014	C. Andrade
1E	SNAP-122919-0014	<i>E. guayaco</i>	Luz directa	21/01/2015	C. Andrade
1F	SNAP-111916-0002	<i>E. guayaco</i>	Luz directa	03/06/2013	C. Andrade
1G	SNAP-095955-0010	<i>E. guayaco</i>	Luz directa	05/06/2013	C. Andrade
1H	SNAP-100610-0019	<i>E. guayaco</i>	Luz directa	06/06/2013	C. Andrade
1I	SNAP-152614-0041	<i>E. guayaco</i>	Luz directa	29/09/2014	C. Andrade
1J	SNAP-103533-0012	<i>E. guayaco</i>	Luz directa	13/06/2013	C. Andrade
1K	SNAP-152209-0022	<i>E. guayaco</i>	Luz directa	13/06/2013	C. Andrade
1L	SNAP-112203-0006	<i>E. guayaco</i>	Luz directa	14/06/2013	C. Andrade
1M	SNAP-100714-0007	<i>E. guayaco</i>	Luz directa	17/06/2013	C. Andrade
2A	WP-20140819-007	<i>E. guayaco</i>	Luz directa	04/06/2014	C. Andrade
2B	WP-20140819-009	<i>E. guayaco</i>	Luz directa	04/06/2014	C. Andrade
3C	SNAP-150221-0003	<i>E. guayaco</i>	Luz directa	10/07/2014	C. Andrade
3D	SNAP-143823-0004	<i>E. guayaco</i>	Luz directa	16/09/2014	C. Andrade
3E	SNAP-145745-0017	<i>E. guayaco</i>	Luz directa	16/09/2014	C. Andrade
4B	SNAP-154621-0066	<i>E. guayaco</i>	Luz directa	17/09/2014	C. Andrade
4C	SNAP-151714-0025	<i>E. guayaco</i>	Luz directa	17/09/2014	C. Andrade
4D	SNAP-155034-0071	<i>E. guayaco</i>	Luz directa	17/09/2014	C. Andrade

5B	SNAP-122919-0014	<i>E. guayaco</i>	Luz directa	21/01/2015	C. Andrade
5C	SNAP-170048-0028	<i>E. guayaco</i>	Luz directa	21/01/2015	C. Andrade
5D	SNAP-144729-0009	<i>E. guayaco</i>	Luz directa	23/01/2015	C. Andrade
5E	SNAP-174925-0093	<i>E. guayaco</i>	Luz directa	23/01/2015	C. Andrade
6B	SNAP-123725-0019	<i>E. guayaco</i>	Luz directa	21/01/2015	C. Andrade
6C	SNAP-145541-0015	<i>E. guayaco</i>	Luz directa	23/01/2015	C. Andrade
6D	SNAP-151302-0018	<i>E. guayaco</i>	Luz directa	23/01/2015	C. Andrade
6E	SNAP-175832-0099	<i>E. guayaco</i>	Luz directa	23/01/2015	C. Andrade
7B	SNAP-111916-0002	<i>E. guayaco</i>	Luz directa	06/03/2013	C. Andrade
7C	SNAP-175325-0004	<i>E. guayaco</i>	Luz directa	21/01/2015	C. Andrade
7D	SNAP-104418-0005	<i>E. guayaco</i>	Fluorescencia	23/12/2014	C. Andrade
7E	SNAP-114203-0026	<i>E. guayaco</i>	Fluorescencia	23/12/2014	C. Andrade
7F	SNAP-111621-0001	<i>E. guayaco</i>	Fluorescencia	23/12/2014	C. Andrade
8B	SNAP-095150-0009	<i>E. guayaco</i>	Luz directa	04/06/2013	C. Andrade
8C	SNAP-180548-0020	<i>E. guayaco</i>	Luz directa	21/01/2015	C. Andrade
8D	SNAP-121035-0003	<i>E. guayaco</i>	Fluorescencia	23/12/2014	C. Andrade
8E	SNAP-120852-0001	<i>E. guayaco</i>	Fluorescencia	23/12/2014	C. Andrade
8F	SNAP-123814-0002	<i>E. guayaco</i>	Fluorescencia	23/12/2014	C. Andrade
9B	SNAP-095955-0010	<i>E. guayaco</i>	Luz directa	05/06/2013	C. Andrade
9C	SNAP-181925-0026	<i>E. guayaco</i>	Luz directa	21/01/2015	C. Andrade
9D	SNAP-161216-0045	<i>E. guayaco</i>	Fluorescencia	24/09/2013	C. Andrade
10B	SNAP-153666-0044	<i>E. guayaco</i>	Luz directa	29/09/2014	C. Andrade
10C	SNAP-141253-0016	<i>E. guayaco</i>	Fluorescencia	23/12/2014	C. Andrade
10D	SNAP-141708-0022	<i>E. guayaco</i>	Fluorescencia	23/12/2014	C. Andrade

11C	SNAP-100610-0019	<i>E. guayaco</i>	Luz directa	06/06/2013	C. Andrade
11D	SNAP-150424-0010	<i>E. guayaco</i>	Fluorescencia	23/12/2014	C. Andrade
11E	SNAP-114847-0082	<i>E. guayaco</i>	Fluorescencia	17/10/2013	C. Andrade
12B	SNAP-145904-0022	<i>E. guayaco</i>	Luz directa	29/09/2014	C. Andrade
12C	SNAP-172439-0007	<i>E. guayaco</i>	Fluorescencia	23/12/2014	C. Andrade
13C	SNAP-152614-0041	<i>E. guayaco</i>	Luz directa	29/09/2014	C. Andrade
13D	SNAP-174501-0015	<i>E. guayaco</i>	Fluorescencia	23/12/2014	C. Andrade
13E	SNAP-184755-0045	<i>E. guayaco</i>	Fluorescencia	21/01/2015	C. Andrade
13F	SNAP-152437-0016	<i>E. guayaco</i>	Fluorescencia	28/03/2014	C. Andrade
14C	SNAP-150657-0026	<i>E. guayaco</i>	Luz directa	29/09/2014	C. Andrade
14D	SNAP-180009-0019	<i>E. guayaco</i>	Fluorescencia	23/12/2014	C. Andrade
14E	SNAP-103409-0007	<i>E. guayaco</i>	Fluorescencia	01/11/2013	C. Andrade
15B	SNAP-103533-0012	<i>E. guayaco</i>	Luz directa	13/06/2013	C. Andrade
15C	SNAP-104127-0020	<i>E. guayaco</i>	Luz directa	13/06/2013	C. Andrade
15D	SNAP-190609-0059	<i>E. guayaco</i>	Luz directa	21/01/2015	C. Andrade
15E	SNAP-111932-0016	<i>E. guayaco</i>	Fluorescencia	05/01/2015	C. Andrade
16B	SNAP-144357-0002	<i>E. guayaco</i>	Luz directa	13/06/2013	C. Andrade
16C	SNAP-150138-0014	<i>E. guayaco</i>	Luz directa	13/06/2013	C. Andrade
16D	SNAP-121718-0062	<i>E. guayaco</i>	Fluorescencia	05/01/2015	C. Andrade
17A	SNAP-152209-0022	<i>E. guayaco</i>	Luz directa	13/06/2013	C. Andrade
17B	SNAP-153522-0031	<i>E. guayaco</i>	Luz directa	13/06/2013	C. Andrade
17C	SNAP-154904-0039	<i>E. guayaco</i>	Luz directa	23/01/2015	C. Andrade
18B	SNAP-112203-0006	<i>E. guayaco</i>	Luz directa	14/06/2013	C. Andrade
18C	SNAP-114731-0007	<i>E. guayaco</i>	Luz directa	14/06/2013	C. Andrade

19A	SNAP-100714-0007	<i>E. guayaco</i>	Luz directa	17/06/2013	C. Andrade
19B	SNAP-102201-0020	<i>E. guayaco</i>	Luz directa	17/06/2013	C. Andrade
19C	SNAP-162417-0031	<i>E. guayaco</i>	Luz directa	17/06/2013	C. Andrade
20A	SNAP-111303-0030	<i>E. guayaco</i>	Luz directa	24/10/2014	C. Andrade
20B	SNAP-104233-0007	<i>E. guayaco</i>	Luz directa	24/10/2014	C. Andrade
20C	SNAP-114628-0060	<i>E. guayaco</i>	Luz directa	24/10/2014	C. Andrade
20D	SNAP-120445-0075	<i>E. guayaco</i>	Luz directa	24/10/2014	C. Andrade

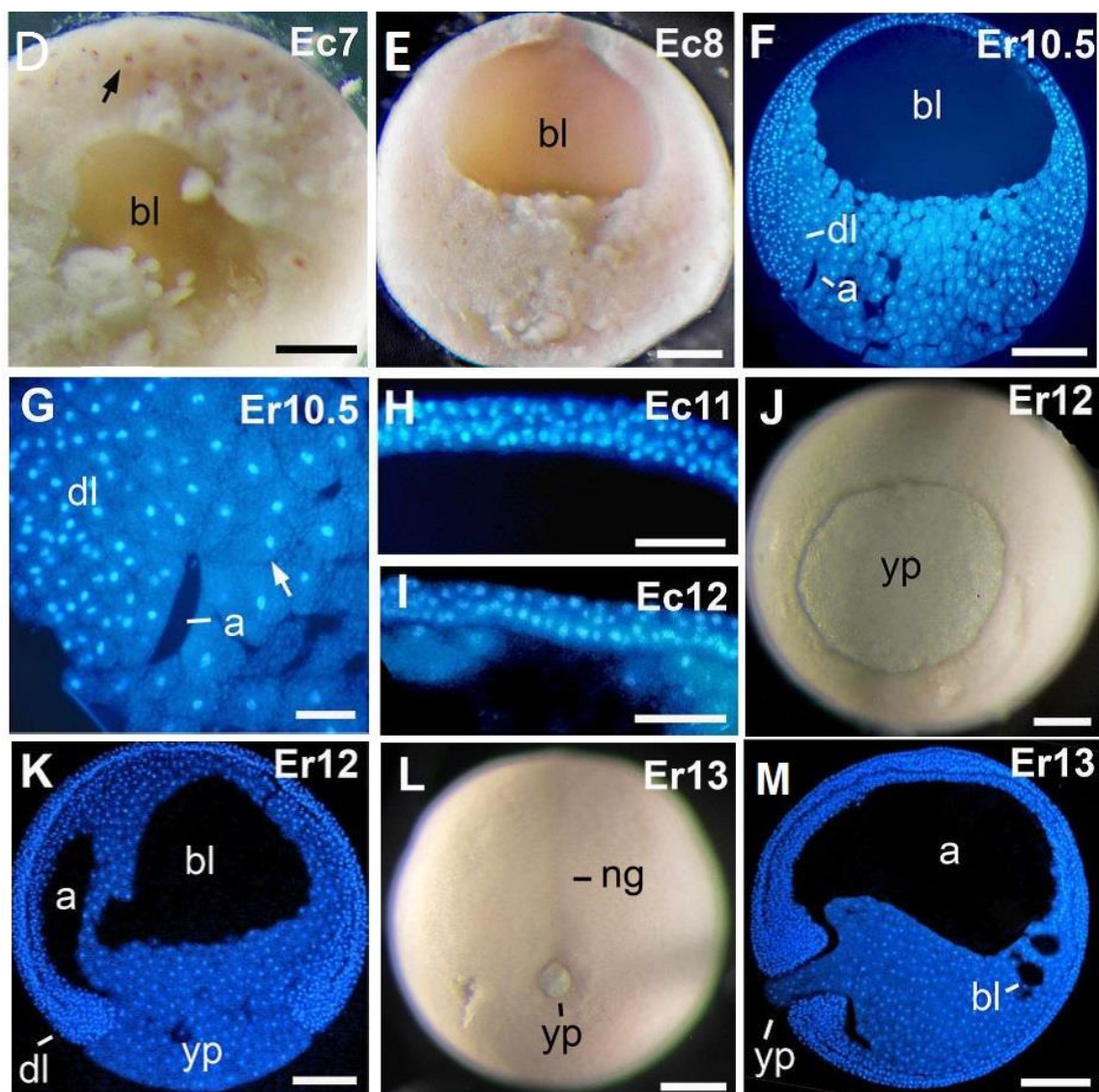
## **10. ANEXOS**



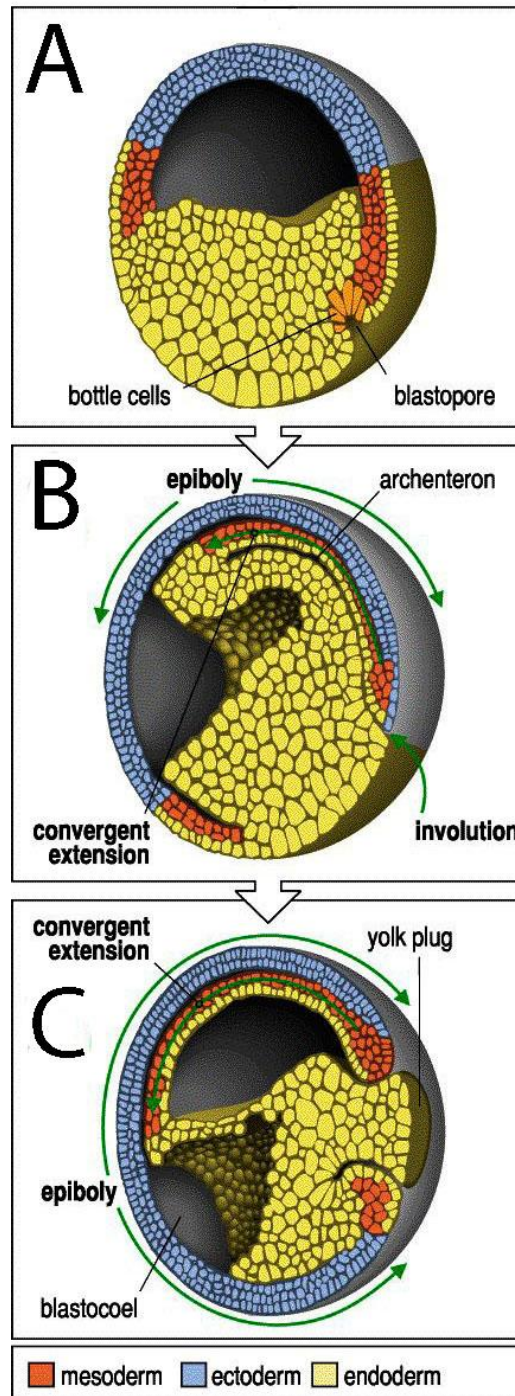
<b>Estadios <i>Engystomops</i></b>	<b>Características de los embriones de <i>Engystomops</i></b>
1	Fertilización
2	Embrión de 2 células.
3	Embrión de 4 células.
4	Embrión de 8 células (No observado)
5	Embrión de 16 células (No observado)
6	Embrión de 32 células.
7	Blástula de células grandes: Pigmento alrededor de los núcleos.
8	Blástula de células medianas: Pigmento alrededor de los núcleos.
9	Blástula avanzada: Pigmento alrededor de los núcleos (No observado)
10	Gástrula temprana: formación del labio dorsal del blastoporo.
11	Gástrula media: Formación del labio ventral, tapón de yema grande.
12	Gástrula tardía: Tapón de yema mediano.
13	Post-gástrula: Cerramiento del blastoporo.
14	Néurula temprana: Formación de la placa neural.
15	Néurula media: Pliegues neurales elevados.
16	Néurula tardía: Tubo neural cerrado.
17	Yema de la cola: La región de la cabeza y yema de la cola sobresalen de la yema.
18	Respuesta muscular: Arcos branquiales sobresalen a los costados de la cabeza.
19	Yema de las branquias: Latido cardíaco e inicia el desarrollo de las branquias.
20	Circulación en branquias: Epidermis pigmentada (No observado).
21	Pigmentación en el ojo (No observado).
22	Desarrollo completo de las branquias: Rama anterior 5 ramificaciones y rama posterior 3 ramificaciones.
23	Eclosión: Pigmento en la región dorsal del cuerpo del embrión.

**Anexo 1. Tabla del desarrollo de *Engystomops* (Romero-Carvajal *et al.*, 2009):**

Características del desarrollo embrionario temprano de las ranas del género *Engystomops*, desde la fertilización hasta la eclosión de los renacuajos.



**Anexo 2. Morfología del desarrollo temprano de los embriones de *E. randi* y *E. coloradum*:** (D) Blastocelo de una blástula de células grandes. (E) Blastocelo de una blástula de células medianas. (F) Sección sagital de una gástrula temprana. (G) Células de botella. (H) Gástrula media. Techo del blastocelo conformado por 3 capas de células. (I) Gástrula tardía. Techo del blastocelo formado por 2 capas de células. (J) Gástrula tardía. (K) Gástrula tardía. (L) Post-gástrula. Formación del surco neural. (M) Sección sagital de una post-gástrula. (Modificado de Romero-Carvajal *et al.*, 2009).



**Anexo 3. Movimientos morfogénicos de los tejidos durante la gastrulación en *Xenopus laevis*:** (A) Inicio de la gastrulación. Formación de células de botella en la región del blastoporo. (B) Movimiento de involución, epíbole y convergencia y extensión. (C) Formación del tapón de yema (Modificado de: Wolpert *et al.*, 2007).

## GASTRULATION PATTERNS

Patterns / Stages	Early	Mid	Late	Post gastrula	
	10.5	12	12.5	13	14

### 1. *Xenopus* / *Engystomops* / *E. guayaco*

Involution					
Arch. elongation					
Nt. elongation					

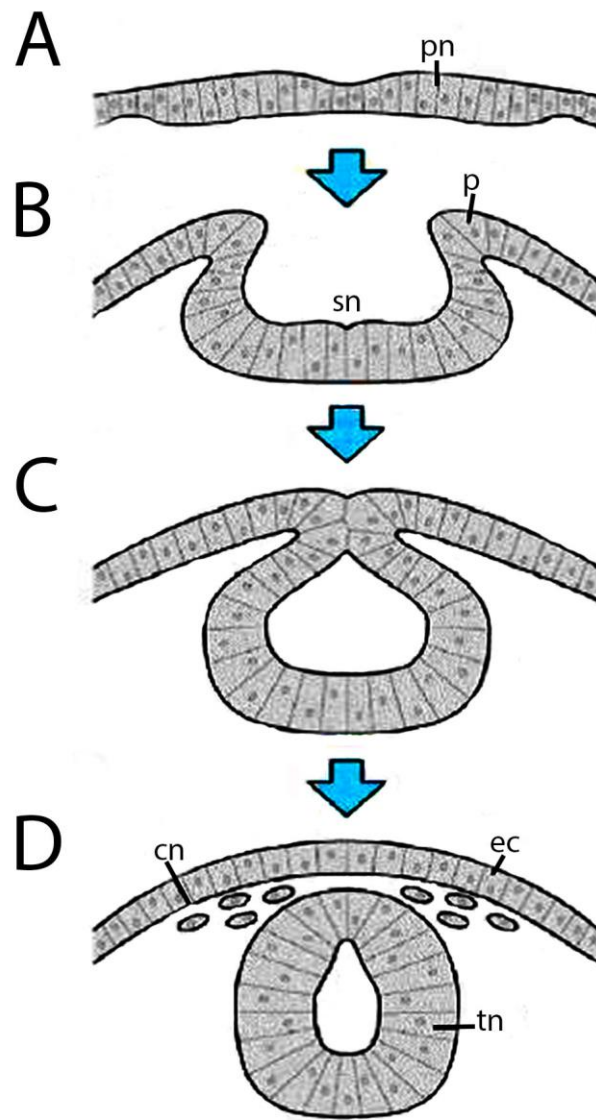
### 2. *Dendrobatids* / *E. coqui*

Involution					
Arch. elongation					
Nt. elongation					

### 3. *Gastrotheca*

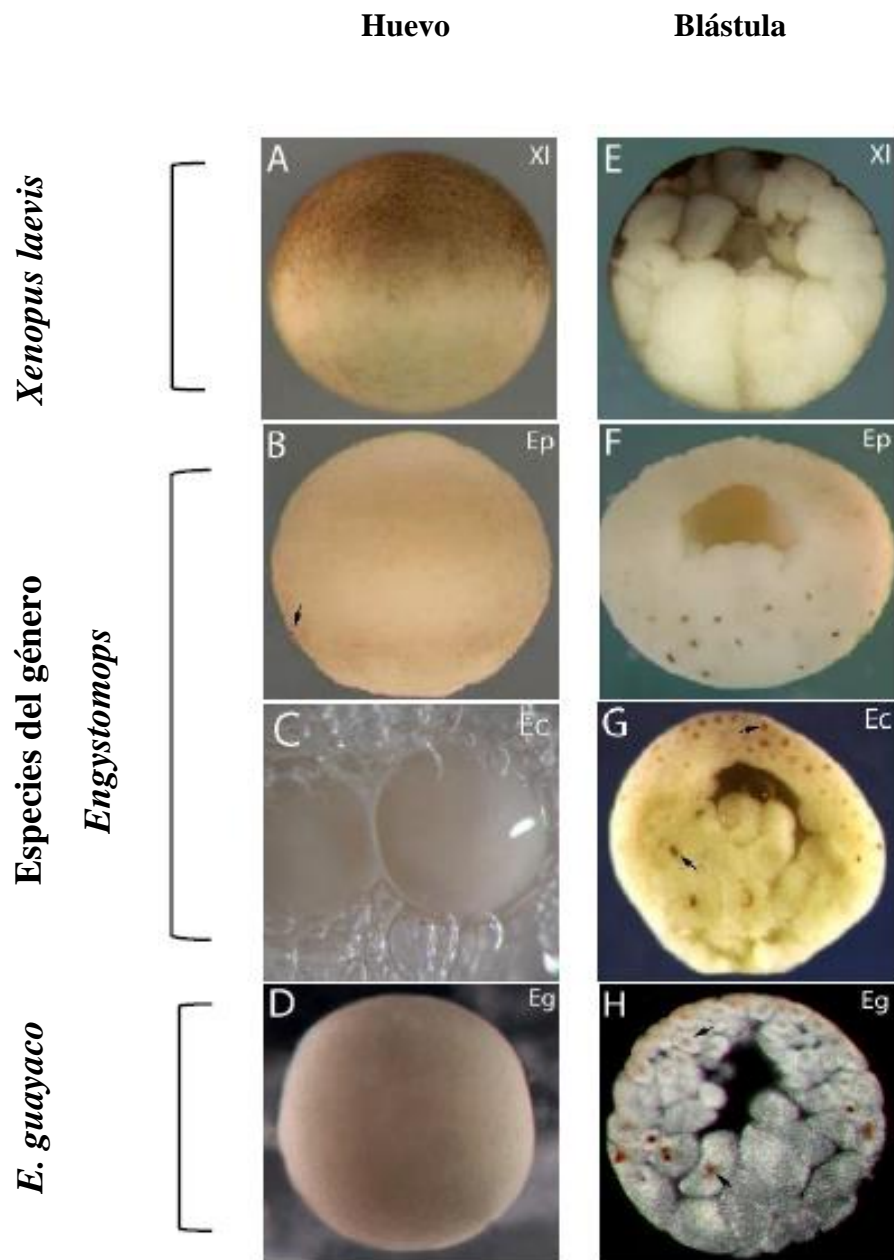
Involution					
Arch. elongation					
Nt. elongation					

**Anexo 4. Patrones de Gastrulación:** Patrones de gastrulación en ranas. Tres patrones de gastrulación se han encontrado de acuerdo con la velocidad del desarrollo y el solapamiento de procesos. Las barras indican el comienzo de la involución, elongación del arquenterón y notocordio en cada patrón (tomado de del Pino *et al.*, 2007).



**Anexo 5. Morfología de la formación del tubo neural:** En todas las imágenes la región dorsal está orientada hacia arriba. (A) Formación de la placa neural. (B) Levantamiento de los pliegues neurales. Se observa el surco neural. (C) Fusionamiento de los pliegues neurales. (D) Formación del tubo neural. Se observa el ectodermo de piel y las células migratorias de la cresta neural craneal (Modificado de: Wolpert *et al.*, 2007).





**Anexo 6. Pigmentación en huevo y blástula media de los embriones de *Xenopus laevis* y varias especies del género *Engystomops*:** (A-D) Embriones enteros en estadio de huevo fertilizado. (E-G) Bisecciones sagitales de embriones en estadio de blástula de células grandes. Se observa pigmento alrededor de los núcleos. (H) Sección sagital de embriones en estadio de blástula de células grandes. Se observa pigmento alrededor de los núcleos (Modificado de: Lee *et al.*, 2009).